



(51) 国際特許分類7 C12N 15/53, 9/04, 1/21, C12P 19/02, 7/60 // (C12N 9/04, C12R 1:01) (C12N 15/53, C12R 1:01) (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:01) (C12N 1/21, C12R 1:02) (C12N 1/21, C12R 1:38)		A1	(11) 国際公開番号  (43) 国際公開日	WO00/55329 2000年9月21日(21.09.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01608 (22) 国際出願日 2000年3月16日(16.03.00) (30) 優先権データ 特願平11/72810 1999年3月17日(17.03.99) JP 特願平11/224679 1999年8月6日(06.08.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒541-8514 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 柴田 孝(SHIBATA, Takashi)[JP/JP] 〒464-0823 愛知県名古屋市千種区松竹町1-38 プリオール牧野3B Aichi, (JP) 市川千代(ICHIKAWA, Chiyo)[JP/JP] 〒461-0001 愛知県名古屋市東区泉2-4-3 ライジング泉601 Aichi, (JP)		松浦光高(MATSUURA, Mitsutaka)[JP/JP] 〒491-0057 愛知県一宮市今伊勢町宮後字宮代62-1 ソレーユ宮代305 Aichi, (JP) 野口祐嗣(NOGUCHI, Yuji)[JP/JP] 〒490-1114 愛知県海部郡甚目寺町大字下萱津字五反田31-1 Aichi, (JP) 斎藤善正(SAITO, Yoshimasa)[JP/JP] 〒666-0151 兵庫県川西市美山台1-4-20 Hyogo, (JP) 山下道雄(YAMASHITA, Michio)[JP/JP] 〒305-0044 滋賀県つくば市並木3-11-11 Ibaraki, (JP) 高田葉子(TAKATA, Yoko)[JP/JP] 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島2-14-10-405 Osaka, (JP) (74) 代理人 高島 一(TAKASHIMA, Hajime) 〒541-0046 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 (湯木ビル) Osaka, (JP) (81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)		
			添付公開書類 国際調査報告書	

(54)Title: SORBITOL DEHYDROGENASE, GENE ENCODING THE SAME AND USE THEREOF

(54)発明の名称 ソルビトールデヒドロゲナーゼ、それをコードする遺伝子およびそれらの用途

(57) Abstract

A gene encoding D-sorbitol dehydrogenase (SLDH); a process for producing SLDH by culturing host cells transformed by an expression vector having the above gene; and a process for producing L-sorbose or 2-keto-L-gulonic acid (2KLGA) by using the above culture. 2KLGA is an important intermediate in the production of L-ascorbic acid. Thus, a process for producing L-ascorbic acid from the 2KLGA obtained by the above process is also provided.

本発明は、D-ソルビトールデヒドロゲナーゼ (SLDH) をコードする遺伝子、該遺伝子を発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養することによるSLDHの製造方法、ならびに該培養物を用いたL-ソルボースまたは2-ケト-L-グロン酸 (2KLGA) の製造方法を提供する。2KLGAはL-アスコルビン酸の製造における重要な中間体である。したがって、本発明はまた、上記方法により得られた2KLGAからのL-アスコルビン酸の製造方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スードン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シェラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スウェーデン
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルガリア・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴー
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドバ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルコメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ	共和国		TT	トリニダット・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴー	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴースラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		

## 明細書

## ソルビトールデヒドロゲナーゼ、それをコードする遺伝子およびそれらの用途

## 技術分野

本発明は、新規ソルビトールデヒドロゲナーゼ（本発明において、ソルビトールデヒドロゲナーゼとはD-ソルビトールを酸化してL-ソルボースに変換する反応を触媒し得る酵素を意味するものとする；以下、SLDHという）、それをコードする遺伝子、該遺伝子を用いた遺伝子操作によるL-ソルボースおよび2-ケト-L-グルロン酸（以下、2KLGAという）の製造方法、並びにそれらの製造に関わる発現系に関する。また、本発明は上記方法により得られる2KLGAを利用したL-アスコルビン酸またはその塩の製造方法に関する。

## 背景技術

L-ソルボースはライヒシュタイン法によるL-アスコルビン酸（ビタミンC）合成における重要な中間体である（図1を参照）。D-ソルビトールを化学的に酸化すると生成物の約半分がD-ソルボースになるのに対し、SLDH活性を有する微生物にD-ソルビトールを接触させると約95%の収率でL体のみが得られることから、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する工程には従来より発酵法が用いられてきた。

一方、2KLGAは、工業的にはL-ソルボースを化学的に酸化することにより合成されている。L-ソルボースデヒドロゲナーゼ（SDH）およびL-ソルボソンデヒドロゲナーゼ（SNDH）による2段階の酵素的酸化反応を経由してL-ソルボースを2KLGAに変換する微生物が知られてはいるが、いずれも2KLGAの生産量が低いのが現状である。

発酵法によって2KLGAを従来よりも効率よく生成させ得る方法として、S

L D H遺伝子を単離し、これを S D HおよびS N D H活性を有する微生物に導入することによりD-ソルビトールから2 K L G Aを合成することができる組換え微生物を作製し、該微生物にD-ソルビトールを接触させる方法が考えられる。

これまでにいくつかのタイプの S L D Hが単離されている[*Agric. Biol. Chem.*, 46(1), 135-141 (1982); *Biokhimiia*, 43(6), 1067-1078 (1978); *J. Biol. Chem.*, 224, 323 (1957); *J. Biol. Chem.*, 226, 301 (1957); *J. Bacteriol.*, 71, 737 (1956) ]。本発明者らはすでに、グルコノバクター・オキシダンス(*Gluconobacter oxydans*)に属する菌株から、膜結合型で大小2つのサブユニットからなり、さらにチトクロームc様ボリペプチドと結合して作用する S L D Hをコードする遺伝子を単離している(国際特許出願WO 99/20763号公報)。しかしながら、他のタイプの S L D H遺伝子のクローニングについては、これまで報告がなされていない。

したがって、本発明の目的は、2 K L G Aの発酵生産に有用な新規 S L D H遺伝子を提供することであり、また、該遺伝子で形質転換された宿主微生物、特に S D HおよびS N D H活性をすでに有する宿主に該遺伝子を導入した形質転換体、あるいは S D H遺伝子およびS N D H遺伝子とともに該遺伝子を導入した形質転換体を提供することである。さらに、本発明の目的は、該微生物を用いてD-ソルビトールからL-ソルボースまたは2 K L G Aを製造する方法を提供することであり、さらに該方法により得られた2 K L G AからのL-アスコルビン酸の製造方法を提供することである。また、本発明の別の目的は、該 S L D H遺伝子で形質転換された宿主微生物の培養による組換え S L D Hの製造方法並びに該 S L D Hを用いた酵素法によるL-ソルボースの製造方法を提供することである。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成するために銳意研究を重ねた結果、 S L D H活性を有するグルコノバクター属の菌株の染色体D N Aライブラリーから、該酵素

のコード領域を含むDNAをクローニングすることに成功した。シークエンスの結果、該DNAは本発明者らが以前に単離したSLDH遺伝子とは全く異なる、新規なSLDH遺伝子を含むことが確認された。さらに、本発明者らは該DNAを含む発現ベクターでシュードモナスを形質転換し、該組換えシュードモナスの培養物から組換えSLDHを精製することに成功した。また、該DNAを含む発現ベクターで形質転換されたシュードモナスを、SDH遺伝子およびSNDH遺伝子を含む発現ベクターでさらに形質転換し、該形質転換体の培養物を用いてD-ソルビトールを2KLG Aに効率よく変換することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下に示す通りである。

- (1) 下記の理化学的性質を有するSLDH。
  - (a) 作用：D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する
  - (b) 分子量：約54kDa
  - (c) 補酵素：NAD (P)<sup>+</sup> 依存性
  - (d) 基質特異性：ソルビトール、マンニトール、アラビトールを特異的に酸化し、キシリトール、リビトール、イノシトール、グリセロールに作用しない
- (2) グルコノバクター・オキシダンスG624株由来である上記(1)のSLDH。
- (3) 上記(2)記載のSLDHと分子進化上、同一の遺伝子を起源とするSLDH。
- (4) グルコノバクター属に属する細菌由来である上記(3)記載のSLDH。
- (5) 以下の(a)または(b)の蛋白質であるSLDH。
  - (a) 配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質
  - (b) 上記(a)のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾されたアミノ酸配列からなり、且つD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する蛋白質

- (6) 上記(1)～(5)のいずれかのSLDHをコードするDNA。
- (7) 以下の(a)または(b)のDNAである上記(6)のDNA。
  - (a) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列からなるDNA
  - (b) 上記(a)の塩基配列とストリンジエントな条件でハイブリダイズし得るDNA
- (8) グルコノバクター属に属する細菌由来である上記(6)または(7)のDNA。
- (9) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列からなるDNAおよびその部分DNAとハイブリダイズし得るDNAであって、SLDH活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
- (10) 上記(9)の遺伝子によってコードされ、SLDH活性を有するグルコノバクター属由来の蛋白質。
- (11) 以下の(a)または(b)のDNAからなるプロモーター遺伝子。
  - (a) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号1～536で示される塩基配列からなるDNA
  - (b) 上記(a)の塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾された塩基配列からなり、且つ少なくとも1種の微生物においてプロモーター活性を有するDNA
- (12) 上記(6)～(9)のいずれかのDNAを含む組換えベクター。
- (13) 上記(6)～(9)のいずれかのDNAを含む発現ベクター。
- (14) SDHをコードするDNAおよび/またはSNDHをコードするDNAをさらに含む上記(13)の発現ベクター。
- (15) 上記(13)または(14)の発現ベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。
- (16) 大腸菌、シュードモナス属、グルコノバクター属、アセトバクター属お

およびシュードグルコノバクター属からなる群より選択される属に属する上記（15）の形質転換体。

（17）該形質転換体がD-ソルビトールを2KLG Aに変換する能力を有するものである上記（15）または（16）の形質転換体。

（18）上記（13）の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中に培養し、得られる培養物から上記（1）～（5）および（10）のいずれかのSLDH活性を有する蛋白質を採取することを含む該蛋白質の製造方法。

（19）上記（13）の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中に培養し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含むL-ソルボースの製造方法。

（20）SDHをコードするDNAおよびSNDHをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中に培養し、得られる培養物またはその処理物に上記（19）の方法により得られるL-ソルボースを接触させる工程を含む2KLG Aの製造方法。

（21）上記（17）の形質転換体を培地中に培養し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含む2KLG Aの製造方法。

（22）上記（20）または（21）の方法により得られる2KLG Aを、L-アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩に変換する工程を含む、L-アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩の製造方法。

本発明のSLDH遺伝子を発現する組換え細胞は、L-ソルボースおよび2KLG Aの発酵生産のための有用な手段となり得る。したがって、本発明はL-アスコルビン酸を簡単且つ大量に製造する上で極めて有用である。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、L-アスコルビン酸合成の反応スキームを示す図である。図中、R

はアルキル基を表す。

第2図は、プラスミドpUCP19-B7SX2およびpUCP19-HCのDNAインサート部分の制限酵素地図、並びにpUCP19-HCのDNAインサート部分のシークエンス・ストラテジーを示す図である。

第3図は、プラスミドpUCP19-SLDHの遺伝子地図を示す図である。

第4図は、発現ベクターpSDH-tufB1-Eco-d9Uの遺伝子地図を示す図である。

第5図は、発現ベクターpBBR(Km)-SDH-SNDHの遺伝子地図を示す図である。

第6図は、発現ベクターpBBR(Tc)-SDH-SNDHの遺伝子地図を示す図である。

第7図は、発現ベクターpUCP19-SDH-SNDHの遺伝子地図を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明のSLDHは、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する、分子量約54kDaの蛋白質であり、補酵素としてNADP<sup>+</sup>またはNAD<sup>+</sup>を要求することを特徴とする。本酵素はソルビトールの他、マンニトール、アラビトールを特異的に酸化することができるが、キシリトール、リビトール、イノシトール、グリセロールには作用しない。

本発明のSLDHは、上記の特徴を有する限りその由来に特に制限はなく、天然に存在する生物起源のものの他、自然もしくは人工の突然変異体、あるいは異種、すなわち外来のSLDH遺伝子を導入して得られる形質転換体由来のものもすべて包含される。好ましくは酢酸菌、特にグルコノバクター属に属する細菌、より好ましくはグルコノバクター・オキシダンス、就中グルコノバクター・オキシダンスG624株 (FERM BP-4415; 国際特許出願公開WO95/

23220号公報) 由来のSLDHが例示される。また、別の好ましい態様においては、本発明のSLDHは、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと分子進化上、同一の遺伝子を起源とするSLDHである。ここで、「分子進化上、同一の遺伝子を起源とする」とは、そのDNA配列分析、生理学的役割等の解析により、分子進化上、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと同一の遺伝子を起源として進化してきたと合理的に判断されるSLDHをいい、これらはDNA配列上、高度な相同意を保持している。これらのSLDHは、好ましくは、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと、DNA配列において60%以上、最も好ましくは80%以上の相同意を示すものである。これらは、後で詳述するように、配列表配列番号2に示されるDNA配列をもとに、適当なプライマーを用いてPCR法により、あるいは適当なプローブを用いてハイブリダイゼーション法によりその遺伝子をクローニングすることができる。

さらに好ましい態様においては、本発明のSLDHは配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、またはSLDH活性を損なわない範囲で、該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾されたアミノ酸配列からなる蛋白質である。

本発明のSLDHは、(1) 該酵素を産生する細胞または組織の培養物を原料として単離精製する方法、(2) 化学的に合成する方法または(3) 遺伝子組換え技術によりSLDHを発現するように操作された細胞から精製する方法等を適宜用いることによって取得することができる。

天然のSLDH産生細胞からのSLDHの単離精製は、例えば以下のようにして行うことができる。すなわち、適当な液体培地で該細胞を培養し、得られる培養物からSLDH活性を含む画分を分離回収する。例えば、該酵素が細胞質に局在する場合(本発明のSLDHはNAD(P)<sup>+</sup>依存性であることから、細胞質に局在することが予測される)、培養物を遠心および/または濾過して菌体を回収後、超音波処理やリゾチーム処理および浸透圧ショック等により該菌体を破碎

し、10,000~40,000 rpm程度で遠心して上清（可溶性画分）を回収する。目的のSLDHは、得られた可溶性画分から、酵素蛋白質の分離精製に常套的に利用されている分離技術を適宜組み合わせることによって精製することができる。このような分離技術としては、例えば、塩析、溶媒沈澱法等の溶解度の差を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）、SDS-PAGE等の分子量の差を利用する方法、イオノン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアバタイトクロマトグラフィー等の荷電を利用する方法、アフィニティクロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性を利用する方法、等電点電気泳動等の等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

化学合成による本発明のSLDHの製造は、例えば配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列を基にして、各配列の全部または一部をペプチド合成機を用いて合成し、得られるポリペプチドを適当な再生条件下で再生（renaturation）させることにより行うことができる。

しかしながら、本発明の一実施態様であるG.オキシダンスG624由來のSLDHは、非生理学的な条件において非常に不安定な酵素であるため、上記の方法では精製の途中で酵素が失活する場合がある。このような酵素は、ヒスチジンタグ法、GST法等の、特定物質にアフィニティーのある付加・改変配列を利用したアフィニティークロマトグラフィーで素早く精製することができる。したがって、本発明のSLDHの特に好ましい取得方法は、以下に詳述するように、該酵素を有する細胞のDNAから該酵素をコードするDNAをクローニングし、さらに遺伝子操作により、金属イオンキレートに吸着し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列を該DNAに付加する工程を含むものである。

酵素遺伝子のクローニングは、通常、以下の方法により行われる。まず、所望の酵素を産生する細胞または組織より、該酵素を上記のような手段により完全または部分精製し、N末端アミノ酸配列をエドマン法により決定する。また、該酵

素を配列特異的プロテアーゼで部分分解して得られるオリゴペプチドのアミノ酸配列を同様にエドマン法により決定する。決定された部分アミノ酸配列に対応する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーまたはプローブとして用いて、該酵素を産生する細胞または組織より調製されたRNAまたはDNAからPCR法またはコロニー（もしくはブラーク）ハイブリダイゼーション法によって該酵素をコードするDNAをクローニングする。

あるいは、完全または部分精製された酵素の全部または一部を抗原として該酵素に対する抗体を常法にしたがって作製し、該酵素を産生する細胞または組織より調製されたcDNAまたはゲノミックDNAライブラリーから、抗体スクリーニングにより該酵素をコードするDNAをクローニングすることもできる。

しかしながら、上記のG.オキシダンスG624由来SLDHのように、不安定で精製が困難な酵素については、その酵素活性をマーカーとして、ゲノミックDNAライブラリーから該酵素の遺伝子をそのプロモーター配列を含む断片としてスクリーニングすることができる。SLDHは、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換するので、生成するL-ソルボースを検出することによりSLDH活性を有するクローンを選択することができる。なお、本法の適用にあたっては、技術的困難を伴う場合が多い。

具体的には、まずSLDH活性を有する細胞または組織から染色体DNAを常法により単離し、これを適当な制限酵素で分解して、好ましくは染色体DNA内に多数の制限部位を有する制限酵素で部分分解して、得られる断片を適当なクローニングベクター中に挿入する。クローニングベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクター等が挙げられるが、大きなDNAインサートを収容できて、且つコロニーとして回収できることから、コスミドベクターやシャロミドベクターが好ましい。ファージベクターやコスミドベクター等を用いる場合は、さらにインビトロパッケージングを行って、ゲノミックDNAライブラリーを得る。

コスミドライブラーを用いる場合は、上記のようにして得られるパッケージング液で適当な指示菌、好ましくは高形質転換能を有する大腸菌コンピテント細胞を感染させた後、固体培地上にプレートして培養する。生じた各コロニーを個別にD-ソルビトールを含む液体培地に植菌して培養する。培養終了後、培養上清を回収して、例えば、レゾルシン-塩酸反応 (Cohen, *J. Biol. Chem.*, 201, 71, 1953)、レゾルシン-第二鉄塩-塩酸反応 (Kulka, *Biochem. J.*, 63, 542, 1956) のようなケトヘキソースの呈色反応を用いてSLDH活性を有するクローニング候補を選択する。

得られたクローニング候補が実際にSLDH活性を有する（すなわち、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する）ことは、例えば、HPLC等により培養上清中のソルボースを検出することにより確認される。

コスミドクローニングのDNAインサートは35~45kbと非常に大きいので、プラスミドへのサブクローニングを容易にするために、予めインサートDNAの非SLDH遺伝子領域の一部を除いて縮小化するのが望ましい。このようなDNAインサートの縮小化方法としては、例えばシャロミドベクター等へのサブクローニングが挙げられる。シャロミドベクターは種々の長さのスペーサーDNAを有するので、コスミドベクターよりも小さな種々の長さのDNAをクローニングできる。本発明においては、例えば、約10~20kbのDNAインサートを収容し得るシャロミドベクターが好ましく使用される。SLDH活性を有するシャロミドクローニング候補は上述の方法により選択することができる。

プラスミドベクターへのサブクローニングは、例えば、上記のようにして得られる複数のシャロミドクローニング候補について制限酵素マッピングを行い、SLDH遺伝子内に制限部位が存在しないことがわかった制限酵素を用いてDNAインサートをさらに縮小化し、同様に制限酵素処理したプラスミドベクターとライゲーションさせることにより行うことができる。

上記のストラテジーとは別に、本発明のSLDHをコードするDNAは、PC

R法を用いて直接クローニングすることもできる。すなわち、該酵素活性を有する細胞または組織由来のゲノミックDNAまたはcDNA（もしくはmRNA）を鑄型とし、増幅断片がSLDHのコード領域をカバーするような適当なオリゴヌクレオチドの対をプライマーとして用いて、常法に従ってPCRを行うことにより、SLDHのコード領域を含むDNA断片を増幅することができる。このような方法は、配列既知のSLDHと分子進化上、同一の起源を有するSLDH遺伝子のクローニングにおいて特に有用である。例えば、G.オキシダンスG624株由来のSLDHと分子進化上、同一の起源を有すると推定される他の細菌由来のSLDH遺伝子をクローニングする場合、配列表配列番号2に示されるDNA配列に基づいて、該配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列を含むDNA断片と高度に相同意を有するDNA断片を増幅し得るようなセンスおよびアンチセンスプライマーを構築してPCR法を実施すればよい。一方、目的のSLDHと高度な相同意を有するSLDHのDNA配列が未知の場合でも、例えば、5'上流領域の比較的保存されている幾つかの配列をセンスプライマー、3'下流領域の比較的保存されている幾つかの相補鎖配列をアンチセンスプライマーとして、PCRを行うことにより、該SLDH遺伝子をクローニングすることができる。SLDHの上下流配列が未知の場合、鑄型DNAと使用するプライマーとがある程度のミスマッチを含んでいても結合可能な程度に、アニーリング温度を低く設定する必要がある。したがって、PCR産物は目的のSLDH遺伝子を含む断片の他に、非特異的な増幅断片を含んだ混合物となる可能性がある。この場合、得られた増幅断片を、適当なクローニングベクター（例えば、TAクローニング用のプラスミドベクター等）、あるいは目的の増幅断片がプロモーター領域を含まない場合は、発現ベクターにクローニングし、これで大腸菌などのコンピテント細胞を形質転換して、上述の方法によりSLDH活性を有する形質転換体をスクリーニングすればよい。

配列既知のSLDHと分子進化上、同一の起源を有するSLDH遺伝子のクロ

ーニングにおいては、さらに別のストラテジーとして、SLDH活性を有する細胞または組織由来のゲノミックDNAまたはcDNA（もしくはmRNA）を雑型とし、既知DNA配列の全部または一部をプローブとして用いて、サザン法等のハイブリダイゼーション法により、直接クローニングする方法が挙げられる。ハイブリダイゼーションの条件は、DNAの由来により、ストリンジエンシーを適宜変化させて用いることができる。例えば、クローニングしようとする微生物の近縁度合い等から、その条件を、塩基配列において約60%以上の相同意を有する配列のみがハイブリッドを形成する条件、また、約80%以上の相同意を有する配列のみがハイブリッドを形成する条件などに、適宜変化させて用いることができる。

上記のようにして得られたDNAインサートの塩基配列は、マキサム・ギルバート法やジテオキシターミネーション法等の公知のシークエンス技術を用いて決定することができる。

本発明のSLDHをコードするDNAは、好ましくは、配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列（但し、該変異アミノ酸配列からなる蛋白質がD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒し得る）をコードするDNAである。さらに好ましくは、本発明のSLDHをコードするDNAは、配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列から実質的になるDNAである。ここで、「実質的になるDNA」とは、該特定塩基配列からなるDNAに加えて、該特定塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし得る塩基配列からなり、且つ該特定塩基配列からなるDNAがコードする蛋白質と同様の理化学的性質を有する蛋白質をコードするDNAを意味する。また、ここで「ストリンジエントな条件」とは、塩基配列において約60%以上の相同意を有するDNAがハイブリダイズし得る条件をいう。ストリンジエンシーは、ハイブリダイズ反応や洗浄

の際の温度、塩濃度等を適宜変化させることにより調節することができる。

また、別の本発明のDNAは、配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列およびその部分DNAとハイブリダイズし得る塩基配列からなり、且つSLDH活性を有する蛋白質をコードする遺伝子をも包含する。したがって、該遺伝子によってコードされるSLDH活性を有する蛋白質、特にグルコノバクター属由来である蛋白質もまた、本発明の範囲に包含される。

本発明のDNAは、上記のようにしてゲノミックDNAから得られるDNAだけでなく、mRNAから得られるcDNAであっても、あるいは配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列を基にして、化学的に合成されるDNAであってもよい。

上記のようにSLDH活性を指標としてゲノミックDNAから得られた、SLDHをコードするDNAは、その5'上流領域にプロモーター遺伝子配列を含んでいる。該プロモーター遺伝子は、好ましくは、配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号1～536で示される塩基配列、または該塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾された塩基配列からなり、且つ少なくとも1種の微生物においてプロモーター活性を有するDNAである。ここで「微生物」としては、細菌（例えば大腸菌、枯草菌、シュードモナス、グルコノバクター、シュードグルコノバクター、アセトバクター等）および放線菌などの原核生物、並びに酵母等の一部の真核生物が好ましく例示される。

本発明はまた、本発明のSLDHをコードするDNAを含む組換えベクターを提供する。本発明の組換えベクターは、原核および/または真核細胞の各種宿主細胞内で複製保持または自律増殖できるものであれば特に限定されず、プラスミドベクターおよびファージベクター等が包含される。当該組換えベクターは、簡便には当該分野において入手可能なクローニングベクターまたは発現ベクターに、SLDHをコードするDNAを適当な制限酵素部位を利用して挿入することによ

って調製することができる。

特に、本発明の組換えベクターは、ある宿主細胞内で機能的なプロモーターの制御下に SLDH をコードする DNA が配置された発現ベクターである。使用されるベクターとしては、原核および／または真核細胞の各種宿主細胞内で機能して、その下流に配置された遺伝子の転写を制御し得るプロモーター領域と、該遺伝子の転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有し、該プロモーター領域と該ターミネーター領域とが少なくとも 1 つの制限酵素認識部位、好ましくはユニークな制限部位を含む配列を介して連結されたものであれば特に制限はないが、形質転換体選択のための選択マーカー遺伝子をさらに含有していることが好ましい。さらに所望により、該発現ベクターは、開始コドンおよび終止コドンを、それぞれプロモーター領域の下流およびターミネーター領域の上流に含んでいてもよい。

宿主細胞として細菌を用いる場合、一般に発現ベクターは上記のプロモーター領域およびターミネーター領域に加えて、宿主細胞内で自律複製し得る複製可能単位を含む必要がある。プロモーター領域には、プロモーター、オペレーターおよび Shine-Dalgarno (SD) 配列が含まれる。例えば、宿主が大腸菌の場合には、プロモーター領域として trp プロモーター、 lac プロモーター、 recA プロモーター、 lpp プロモーター、 tac プロモーター等が、また、宿主が枯草菌の場合には、プロモーター領域として SPO1 プロモーター、 SPO2 プロモーター、 penP プロモーター等が挙げられる。ターミネーター領域としては、通常使用されている天然または合成のターミネーターを用いることができる。また、選択マーカー遺伝子としては、テトラサイクリン、アンビシリン、カナマイシン等の各種薬剤に対する耐性遺伝子を用いることができる。開始コドンとしては通常 ATG が用いられるが、場合によって GTG を使用することもできる。終止コドンとしては常用の TGA、 TAA および TAG が用いられる。

本発明の SLDH をコードする DNA が該酵素を産生する細胞または組織由來

のゲノミックDNAから調製され、本来のプロモーターおよびターミネーター領域を含有する形態で得られる場合には、本発明の発現ベクターは、形質転換しようとする宿主細胞内で複製保持または自律増殖できる公知のクローニングベクターの適当な部位に該DNAを挿入することによって調製することができる。用いられるクローニングベクターとしては、宿主が細菌の場合、大腸菌由来のpBR系ベクター、pUC系ベクター等、あるいは枯草菌由来のpUB110、pTP5、pC194等が例示される。

本発明のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターが、組換えSLDHの製造のために使用される場合、特に該SLDHが非常に不安定で、通常の精製法では精製途中で酵素が失活する可能性がある場合には、以下のような改変SLDHコーティング配列を含む発現ベクターを用いることが特に好ましい。該改変SLDHコーティング配列は、本来のSLDHアミノ酸配列の末端にSLDHの精製を迅速化し得る特定のアミノ酸配列が付加された形態で、SLDHが発現するように、本来のSLDHコーティング配列の末端に該特定アミノ酸配列をコードする塩基配列が付加された配列からなる。SLDHの精製を迅速化し得る特定のアミノ酸配列としては、金属イオンキレートに吸着し得るアミノ酸配列、好ましくはヒスチジン、リジン、アルギニン等の塩基性アミノ酸からなる配列、より好ましくはヒスチジンからなる配列が挙げられる。このような配列はSLDHのアミノ末端またはカルボキシル末端に付加することができるが、カルボキシル末端に付加するのがより好ましい。このような改変SLDHコーティング配列は、本来のSLDHコーティング配列の末端配列と一致する塩基配列に、付加すべきアミノ酸配列をコードする塩基配列を付加してなるオリゴヌクレオチドを合成し、これを一方のプライマーとして用い、SLDH DNAを鑄型としてPCRを行うことにより構築することができる。結果として得られる組換えSLDHは、以下に詳述するように、付加されたアミノ酸配列を吸着させ得る金属イオンキレートを固定化した担体を用いて迅速に単離精製することができる。

また、本発明のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターが、2KLGAの製造のために使用される場合には、当該DNAに加えて、SDHおよび/またはSNDHをコードするDNAを、宿主細胞内で発現し得る形態で含有する発現ベクターを用いることもできる。SLDHをコードするDNA、SDHをコードするDNAおよびSNDHをコードするDNAは、それぞれ別のプロモーターの制御下に置かれてもよく、あるいはそのうちの2つ以上が同一のプロモーターの制御下にタンデムに配置してもよい。

本発明の形質転換体は、本発明のSLDHをコードするDNAを含有する組換えベクターで宿主細胞を形質転換することにより調製することができる。宿主細胞は使用する組換えベクターに適合し、形質転換され得るものであれば特に限定されず、当分野で通常使用される天然に存在する細胞あるいは人工的に作製された変異体細胞もしくは組換え体細胞など種々の細胞が利用できる。好ましくは細菌、特に大腸菌（例えばDH5α、HB101等）、枯草菌、シュードモナス属細菌（例えばシュードモナス・フルオレセンス等）、グルコノバクター属細菌（例えばグルコノバクター・オキシダンス等）、シュードグルコノバクター属細菌、アセトバクター属細菌等である。

組換えベクターの宿主細胞への導入は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、宿主が大腸菌や枯草菌等の細菌の場合には、Cohen らの方法[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110 (1972)]、プロトプラスト法[*Mol. Gen. Genet.*, 168: 111 (1979)]、コンピテント法[*J. Mol. Biol.*, 56: 209 (1971)]、エレクトロボレーション法等が挙げられる。

特に、本発明の形質転換体は、本発明のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞である。該形質転換体がD-ソルビトールから2KLGAを製造することを目的として作製される場合、宿主細胞はL-ソルボースを2KLGAに変換する能力を有するものである必要がある。好ましくは、該宿主細胞はSDHおよびSNDH活性を産生する細胞である。天然に存在

するこのような細胞としては、例えばグルコノバクター属やアセトバクター属、シュードグルコノバクター属等に属する細菌、具体的にはグルコノバクター・オキシダンス T-100 (FERM BP-4415; 国際特許出願公開WO 95/23220号公報) 等が挙げられる。また、人工的に作製されたこのような細胞としては、上記の天然に存在する細菌等から単離されたSDHおよびSNDHをコードするDNAを機能的に含む発現ベクターで形質転換された細胞、好ましくは大腸菌、シュードモナス属細菌、グルコノバクター属細菌、シュードグルコノバクター属細菌、アセトバクター属細菌等が挙げられる。具体的には、*E. coli* JM109-pUC19SD5 (国際特許出願公開WO 94/20609号公報)、グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-tufB1、グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-trp6、グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-PL1、グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-tac8 (以上、国際特許出願公開WO 95/23220号公報) 等が例示される。

また、本発明の形質転換体は、上記のようにSLDHをコードするDNAに加えて、SDHをコードするDNAおよび/またはSNDHをコードするDNAを、宿主細胞内で発現し得る形態で含有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによっても得ることができる。該発現ベクターがSDHをコードするDNAまたはSNDHをコードするDNAのいずれか一方を欠く場合、当該DNAを含む別の発現ベクターとともにコ・トランスフォーメーションすればよい。

本発明の組換えSLDHは、上記のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地内で培養し、得られる培養物からSLDHを採取することにより製造することができる。

用いられる栄養培地としては、炭素源としてグルコース、フルクトースなどの糖類、グリセロール、好ましくはL-ソルボース、D-ソルビトールを含有するものである。また無機もしくは有機窒素源 (例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、カゼインの加水分解物、酵母抽出物、ポリペプトン、バクトリブト

ン、ビーフ抽出物等）を含んでいてもよい。さらに所望により、他の栄養源（例えば、無機塩（例えば、ニリン酸ナトリウムまたはニリン酸カリウム、リン酸水素二カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム）、ビタミン類（例えば、ビタミンB1）、抗生素質（例えば、アンビシリン、カナマイシン）など）を培地中に添加してもよい。好ましくは、D-ソルビトール、酵母エキス、 $\text{CaCO}_3$ 、グリセロールを組成とする培地である。また、培地の糖（D-ソルビトール）の濃度は、通常1～50%、好ましくは2～40%である。

形質転換体の培養は、通常pH5.5～8.5、好適にはpH6～8の条件下、通常18～40°C、好適には20～35°Cで5～150時間で行われる。

SLDHの精製は、SLDH活性の存在する画分に応じて、通常使用される種々の分離技術を適宜組み合わせることにより行うことができる。本発明のSLDHはNAD(P)<sup>+</sup>依存性であることから、通常、形質転換体の可溶性画分に局在する可能性が高い。その場合、培養終了後に培養物を濾過もしくは遠心分離して菌体を回収し、超音波処理やリゾチーム処理および浸透圧ショック等によって細胞を破碎して得られる菌体抽出液を用いる。

組換えSLDHが、上述のようにその末端に特定のアミノ酸配列を付加された形態で産生される場合、該SLDHは、該特定アミノ酸配列を吸着させ得る金属イオンキレートを固定化した担体を用いたクロマトグラフィー処理（固定化金属アフィニティーコロマトグラフィー；IMAC）により、迅速且つ容易に精製することができる。使用される金属イオンキレート吸着体は、遷移金属、例えばコバルト、銅、ニッケル、鉄の二価イオン、あるいは鉄、アルミニウムの三価イオン等、好ましくはコバルトの二価イオン含有溶液を、リガンド、例えばイミノジ酢酸基、ニトリロトリ酢酸基、トリス（カルボキシメチル）エチレンジアミン基等を付着したマトリックスと接触させて該リガンドに結合させることにより調製される。キレート吸着体のマトリックス部は通常の不溶性担体であれば特に限定されない。

本発明のL-ソルボースの製造方法は、上記のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物、あるいはSLDH活性が該形質転換体の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液にD-ソルビトールを接触させることにより、L-ソルボースを生成させる。培養物にD-ソルビトールを接触させる方法には、D-ソルビトールを含有する培地中で該形質転換体を培養する方法も包含される。

本発明はまた、上記方法により取得されたL-ソルボースを利用した2KLGAの製造方法を提供する。すなわち、L-ソルボースを2KLGAに変換し得る宿主細胞、好ましくはSDHをコードするDNAおよびSNDHをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、適当な培地中で培養し、得られる培養液、あるいはSDHおよびSNDH活性が該宿主細胞の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液に上記方法により取得されたL-ソルボースを接触させることにより、2KLGAを生成させる。培養物にL-ソルボースを接触させる方法には、L-ソルボースを含有する培地中で該宿主細胞を培養する方法も包含される。

本発明の別の2KLGAの製造方法は、上記のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された、L-ソルボースを2KLGAに変換し得る宿主細胞を、適当な培地中で培養し、得られる培養液、あるいはSLDH、SDHおよびSNDH活性が該宿主細胞の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液にD-ソルビトールを接触させることにより、2KLGAを生成させる。培養物にD-ソルビトールを接触させる方法には、D-ソルビトールを含有する培地中で該宿主細胞を培養する方法も包含される。

本発明のL-ソルボースの製造方法および2KLGAの製造方法において用いられる培地および培養条件は、上記のSLDHの製造方法において用いられるものと同一であるかもしくは一部が異なるものでよい。

また、菌体抽出液にD-ソルビトールまたはL-ソルボースを接触させる場合

には、培養終了後の培養物を遠心分離または濾過して菌体を回収し、これを適当な緩衝液、例えば酢酸緩衝液中に懸濁して、超音波処理等により菌体を破碎した後遠心処理して得られる上清を菌体抽出液として使用すればよい。

このようにして生産されたL-ソルボースまたは2 K L G Aは、反応液（D-ソルビトールまたはL-ソルボースを含有する培地中で該形質転換体を培養する場合には培養上清）から一般に用いられる精製方法（例えば、透析、ゲル濾過、適当な吸着材上でのカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなど）を用いて精製することができる。

精製された2 K L G Aは、従来公知の手段により、L-アスコルビン酸またはその塩（例えば、アルカリ金属もしくはアルカリ土類金属との塩）に変換することができる。このような手段は特に限定されないが、例えば、2 K L G Aに塩酸などの強酸を加えて加熱する方法が挙げられる。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、これらは単なる例示であって、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

### 実施例1 SLDHのクローニング

#### （1）染色体DNAの調製

G. オキシダンスG 6 2 4株 (FERM BP-4415; 国際特許出願公開WO 95/23220号公報)のシングルコロニーを2.5%マンニトール、0.3%ポリペプトンおよび0.5%酵母エキスからなる培地(pH 6.0)で37°C、48時間培養した。菌体を遠心(6,000 rpm, 10分間)により集めて、滅菌水1mlに懸濁した。懸濁液をSTE緩衝液[20%スクロース-50 mM Tris-HCl(pH 8.0)-1 mM EDTA]1mlで希釈し、リゾチーム2mgを加えた後、37°Cで30分間放置した。これに、サルコシル溶液[1%ラウロイルサルコシレート-100 mM EDTA(pH 8.5)]2.5mlとプロテイナーゼK(終濃度100 μg/ml)を加え、50°Cで2時間放置した。

これにセシウムクロライド 5.5 g および 5 mg/ml エチジウムプロミド 0.3 ml を加え、20°C、50,000 rpm で 16 時間超遠心した。染色体 DNA を含む部分を単離し、TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0) - 1 mM EDTA] 30 ml で溶解した後、5 L の 1 mM EDTA で 2 回透析した。透析液をイソブタノールで 4 回、フェノールで 2 回、クロロフォルムで 3 回洗浄した後、エタノール沈澱により精製した。これを TE 緩衝液 10 ml で溶解し、180 µg/ml の染色体 DNA 溶液を得た。

#### (2) コスミドライブラーの作製

大腸菌 DH1/pcos6EMBL (ATCC 37571; 住友ファーマ・インターナショナル (株) 経由で ATCC より購入) のシングルコロニーを 50 µg/ml カナマイシン含有 LB 培地 [1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、1% 塩化ナトリウム (pH 7.4)] 3 ml 中で 37°C、16 時間培養した後、その 0.5 ml を 50 µg/ml カナマイシン含有 LB 培地 50 ml を入れた 500 ml 容三角フラスコに植菌した。37°C で 8 時間培養した後、遠心 (6,000 rpm, 10 分間) により集菌し、QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN 社) で コスミド pcos6EMBL を精製した。pcos6EMBL 25 µg を 50 U の BamHI で 37°C、2 時間消化後、エタノール沈澱により精製した。これを 3 U の仔ウシ小腸由来アルカリ fosfatas (CIAP) で 37°C、1 時間 脱リン酸処理し、エタノール沈澱により精製した。一方、上記 (1) で得られた G. オキシダンス G624 株の染色体 DNA 100 µg を 5 U の Sau3AI で 37°C、1 分間部分消化後、エタノール沈澱により精製した。該部分消化物約 1.5 µg と pcos6EMBL の BamHI 消化物約 3 µg を、3 U の T4 DNA リガーゼで 4°C、16 時間ライゲーションした。このうち 3 µl を GIGAPACK II Gold Packaging Extract (STRATAGENE 社) でインピトロパッケージングした。このパッケージング液を SM バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.5) - 100 mM NaCl - 8 mM MgSO4 - 0.1% ゼラチン] で 50

倍希釈し、その $25\mu\text{l}$ で指示菌（大腸菌XL1-Blue MRA） $25\mu\text{l}$ を感染させた後、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン含有LBプレートに播き、 $37^\circ\text{C}$ で1晩放置した。約400個のコロニーが得られたので、約40万クローンのコスミドライブラーが得られたことになる。

### (3) SLDH活性を有するクローンのスクリーニング

5%ソルビトールおよび $50\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンを含有する0.9倍希釈LB培地を1ウェルあたり $150\mu\text{l}$ 入れた96ウェルプレート丸底（ナルジェ社）で、368個のコスミドクローンを $30^\circ\text{C}$ 、3日間ゆるやかに振盪培養した。遠心（2,000 rpm, 10分間）後、培養上清 $20\mu\text{l}$ に $0.5\text{mg}/\text{ml}$ レゾルシン-エタノール溶液 $30\mu\text{l}$ と $0.216\text{mg}/\text{ml}$ 硫酸鉄(III)アンモニウム-塩酸溶液 $30\mu\text{l}$ を加えた後、 $80^\circ\text{C}$ で1時間加熱した。培地のみを同様に反応させたものをコントロールとし、コントロールよりも強く褐色を呈した1A4、1A5、4A9の3クローンをソルボース（フラクトース）への変換能を有するクローンとして選択した。これらの培養上清をHPLC〔カラム：Polyspher OA KC (E. メルク社), 7.8×300 mm; 温度：室温; 移動相： $0.01\text{N H}_2\text{SO}_4$ ; 流量： $0.4\text{ml}/\text{分}$ ; 検出：RI〕で分析したところ、いずれのクローンもソルボースが検出されたので、これら3クローンをSLDH活性を有するクローンとした。これらコスミドクローンのインサート部分の長さはいずれも約40 kbであった。

### (4) シャロミドベクターへのサブクローニング（インサートの縮小化）

SLDH活性を有する300 ngのコスミドクローン1A4を、20 mUのSau3AIで $37^\circ\text{C}$ 、1時間部分消化した。また、シャロミド9-28（ニッポンジーン社） $1\mu\text{g}$ を4 UのBamHIで $37^\circ\text{C}$ 、1時間消化した。この2つの溶液を混合後、エタノール沈澱により精製し、2倍希釈したTE緩衝液 $5\mu\text{l}$ で溶解したものを、1 UのT4 DNAリガーゼで $4^\circ\text{C}$ 、16時間ライゲーションした。このうち $1\mu\text{l}$ をGIGAPACK II XL Packaging Extract (STRATAGENE社)でイ

ンビトロパッケージングした。このパッケージング液 $75\mu\text{l}$ とSMバッファー $75\mu\text{l}$ を混合し、これで指示菌(大腸菌DH-1) $150\mu\text{l}$ を感染させた後、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンビシリン含有LBプレートに播き、 $37^\circ\text{C}$ で1日インキュベートした。出現したコロニーのうち95個を、5%ソルビトールおよび $50\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンを含有する0.9倍希釈LB培地を1ウェルあたり $150\mu\text{l}$ 入れた96ウェルプレート丸底(ナルジエ社)で、 $30^\circ\text{C}$ 、3日間ゆるやかに振盪培養した。遠心( $2,000\text{ rpm}$ , 10分間)後、培養上清 $20\mu\text{l}$ に $0.5\text{ mg}/\text{ml}$ レゾルシン-エタノール溶液 $30\mu\text{l}$ と $0.216\text{ mg}/\text{ml}$ 硫酸鉄(III)アンモニウム-塩酸溶液 $30\mu\text{l}$ を加えた後、 $80^\circ\text{C}$ で1時間加熱した。培地のみを同様に反応させたものをコントロールとし、コントロールより強く褐色を呈したG1、C2、A4、B7、H10、B12の6クローンをソルボースへの変換能を有するクローンとした。これらのシャロミドクローンのインサート部分の長さはいずれも約 $15\text{ kb}$ であった。

#### (5) SLDH遺伝子のプラスミドベクターへのサブクローニング

これまでに得られたクローンの制限酵素地図から、SLDH遺伝子にはSac I部位およびXba I部位が存在しないことがわかった。そこで、 $1\mu\text{g}$ のシャロミドB7を $10\text{ U}$ のSac Iおよび $10\text{ U}$ のXba Iで消化し、約 $6\text{ kb}$ (B7SX3)と約 $9\text{ kb}$ (B7SX2)のSac I-Xba I断片を得た。この2つの断片をそれぞれ大腸菌-シュードモナスシャトルベクターpUCP19[pUC19のNar I部位に、pRO161.4由来の $1.8\text{ kb}$ のPst I断片が挿入されており、大腸菌DH5 $\alpha$ F'(ATCC 87110)から精製した]に連結した後、シュードモナス(*Pseudomonas*)(その後、本菌株はシュードモナスsp. F-1と命名された。以下、本命名を用いる。)をエレクトロポーレーション法にて形質転換し、Ps. /pUCP19-B7SX3とPs. /pUCP19-B7SX2を得た。コンビテント細胞の調製および形質転換の条件は大腸菌のそれに準じて行った。この2クローンをソルビトールを含む培地で培養したと

ころ、Ps./pUCP19-B7SX2にソルボースへの変換能が認められた。そこで、Ps./pUCP19-B7SX2を、5%ソルビトール、1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%塩化ナトリウム、50μg/mlアンビシンからなる培地(pH 7.4)で30°C、4日間培養したところ、2.4mg/mlのソルボースが得られた(変換率5%)。このソルボースをHPLCで分取し、標品との保持時間の一致を確認した。HPLCは上記(3)と同様の条件にて行った。さらに、GC/MS[カラム:DB-5(J & W Scientific), 0.32mm×30m(film 0.25μm); 温度:インジェクション=230°C, カラム=100°C(5分)→10°C/分で10分間加温→200°C(5分)→30°C/分で1分間加温→230°C(4分), 検出=230°C; 流量:圧力制御20kPa(He)]を用いて、標品とのマスバターンの一致を確認した。

#### (6) SLDH遺伝子の塩基配列決定

SLDH活性を発現するシュードモナスの形質転換株Ps./pUCP19-B7SX2のプラスミドpUCP19-B7SX2のインサート部分の制限酵素地図は図2のように推定された。1μgのpUCP19-B7SX2を10UのHind IIIで37°C、1時間消化して、約4kbのHind III-Hind III断片を得た。このHind III-Hind III断片をベクター-pUCP19に連結し、プラスミドpUCP19-HCを構築した。そして、このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、Ps./pUCP19-HCを得た。この形質転換株をソルビトールを含む培地で培養したところ、SLDH活性の発現が認められたので、このHind III-Hind III断片にSLDH遺伝子の全長が含まれていることがわかった。従って、この約4kbのHind III-Hind III断片の塩基配列を決定することにした。まず、pUCP19-HCのインサート部分を約1.1kbのSph I-Sph I断片(S1)、約0.8kbのEco RI-Sph I断片(ES)および約1.3kbのEco RI-Eco RI(E1)断片の3つに分け(図2)、それぞれpUC18にサブクローニングし、pUC

18-S1、pUC18-ESおよびpUC18-E1を得た。

プラスミドpUCP19-HC、pUC18-S1、pUC18-ESおよびpUC18-E1をテンプレートにして、M13シークエンシングプライマーであるユニバーサルプライマーおよびリバースプライマー（New England Labs.）を用いて最初のシークエンシングを行った。なお、サンプルは BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems 社) で蛍光標識し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) で分析した。次に、下に示した11種類のプライマーを合成し、pUCP19-HCをテンプレートにしてシークエンシングを行い、約4kbのHind III-Hind III断片の塩基配列を決定した（配列表配列番号2）。

#### SLDH遺伝子シークエンス用プライマー

SL1	GCTGCTGAGTGATCCG	（配列表配列番号3）
SL2	GACTGCTACTTCGATCC	（配列表配列番号4）
SL3	CCTACACCTAGCCTGC	（配列表配列番号5）
SL4	CAGTGCCGTATGAGG	（配列表配列番号6）
SL5	TCCTGATCTCGGTGCG	（配列表配列番号7）
SL6	GATGCTTCAGCACGGC	（配列表配列番号8）
SL7	GACGATCACGGAAAGGC	（配列表配列番号9）
SL8	GGTTACGTGGTCGAGG	（配列表配列番号10）
SL9	CTATACGTGACAGGTCC	（配列表配列番号11）
SL10	GCGCGATCTGGATACG	（配列表配列番号12）
SL11	CGAGGATCTCGAACGG	（配列表配列番号13）

塩基配列の解析から、1455bpのORFが見出された（塩基番号537～1991）。したがって、SLDHは485アミノ酸からなり、分子量は約54kDaであると推定された。また、ホモロジー検索の結果、シードモナス・フルオレセンスのマンニトールデヒドロゲナーゼと42%のホモロジーがあることが

わかった。

### 実施例 2 組換え SLDH の製造

#### (1) ヒスチジン-Tag を有する SLDH (以下、His-tagged SLDH という) を発現するプラスミドの構築

組換え蛋白質を精製するのに、6×ヒスチジンを利用した Tag システムは非常に簡便な方法である。すなわち、6 つのヒスチジン Tag を持つ蛋白質を発現させ、コバルトやニッケルなどの金属とヒスチジン残基との相互作用を利用して、IMAC により該蛋白質を分離するというものである。まず、SLDH の C 末端側に 6×His を挿入するために、以下に示す 2 対のプライマーをそれぞれ用い、pUCP19-HC (5 ng) をテンプレートにして、pfu DNA ポリメラーゼ (2.5 U) で PCR を行った (94°C, 30 秒 → 55°C, 2 分 → 72°C, 2 分, 25 サイクル)。なお、プライマー (各 20 pmol) は 99°C で 4 分間加熱後、急冷したものを用いた。

#### PCR 1

プライマー 1 (センス) [SLDH コーディング配列内の NheI 部位 (下線部) 付近の配列と一致する配列]

CGGATTGCTAGCGATGGC (配列表配列番号 14)

プライマー 2 (アンチセンス) [SLDH コーディング配列の 3' 末端と一致する配列、6×His (H)、終止コドン (\*) および BamHI 部位 (下線部) を含む]

ATCGAGGATCC TCA ATGATGATGATGATG GGCCGGGATGGCGGC

\* H H H H H H (配列表配列番号 15)

#### PCR 2

プライマー 3 (センス) [BamHI 部位 (下線部) および SLDH 遺伝子の終止コドンの直後の配列と一致する配列を含む]

ATCGAGGATCCATTGGCTTTAGGGTAGC (配列表配列番号 16)

プライマー4 (アンチセンス) [SLDH遺伝子の3'非コーディング領域内のBglII部位付近の配列と一致する配列およびSacI部位 (下線部) を含む]

TAGCTGAGCTCATGGGACAGATCTGAGC (配列表配列番号 17)

PCR 1で特異的に増幅した約360bpの断片をNheIおよびBamHIで消化し、また、PCR 2で特異的に増幅した約100bpの断片をBamHIおよびSacIで消化した。これとは別に、pUCP19-HCをBglIIおよびPstIで消化して得られる約2kbの断片を、pUCP19のBamHI-PstI断片に挿入してインサートのBglII部位より下流を除いたプラスミドpUCP19-SLDHを得た (図3)。これをNheIとSacIで消化し、得られる約6.2kbの断片を、上記2つのPCR増幅断片とT4DNAリガーゼで連結し、pUCP19-SLDH-Hisを構築した。このプラスミドでシードモナスを形質転換し、Ps. /pUCP19-SLDH-Hisを得た。

#### (2) His-tagged SLDH の精製

形質転換株Ps. /pUCP19-SLDH-Hisの凍結保存菌体の1白金耳を、50μg/mlアンビシリンを含むLB培地2mlを入れた15ml容遠心チューブ (コーニング社) に植菌し、30°Cで16時間培養した。その1.5mlを5%ソルビトールと50μg/mlアンビシリンを含むLB培地50mlを入れた500ml容三角フラスコに植菌し、25°Cで3日間培養した。遠心 (6,000 rpm、4°C、5分間) により集菌した後、100mM NaCl含有20mM Tris-HCl (pH 8.0) 10mlで懸濁した。該懸濁液を超音波破碎装置 (トミー社UD-201型) で5分間 (50%インターバル) 処理し、遠心 (15,000 rpm、4°C、10分間) した後、上清を回収し無細胞抽出液とした。2mlのTARON樹脂 (CLONTECH社) を15ml容遠心チューブ (コーニング社) に入れ、100mM NaCl含有20mM Tris-HCl (pH 8.0) 10mlで2回洗浄して平衡化した。そして、5mlの上記無細胞抽

出液を加え、室温で20分間振盪することで His-tagged SLDH を吸着させた後、100 mM NaCl 含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 ml で3回、10分かけて洗浄した。次に、10 mM、30 mM、50 mM および 100 mM イミダゾールをそれぞれ含有する 100 mM NaCl 含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 2 ml を順次加え、それぞれ室温で2分間振盪して His-tagged SLDH を溶出した。その結果、30 mM～50 mM イミダゾール画分に SLDH 活性が溶出した。該画分を SDS-PAGE 分析したところ、ほぼ単一のバンドが検出された。

### (3) N末端アミノ酸配列分析

上記(2)で精製した His-tagged SLDH を、ゲル濃度 12.5% のマルチゲル(第一化学薬品製)を用い、40 mA の電流で1時間電気泳動した後、ホライズプロット(アトー社)を用いて、PVDF膜(イモビロンPSQ; ミリポア社)に転写した。膜をクマシーブリリアントブルーG-250で染色した後、約 55 kDa の SLDH と思われるバンドをハサミで切り出した。この PVDF 膜をプロテインシークエンサー G100A(ヒューレットパッカード社)と PTH アライザー 1090 型(ヒューレットパッカード社)でアミノ酸配列分析したところ、SLDH 遺伝子の ORF から予想される N 末端アミノ酸配列と一致する配列(MITRETLKSL; 配列表配列番号 18)が得られた。

### (4) SLDH 活性の確認

アブライする無細胞抽出液を 10 ml とすること、His-tagged SLDH 吸着後の樹脂の洗浄を6回行うこと、並びに 50 mM イミダゾールおよび 100 mM NaCl 含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 5 ml で His-tagged SLDH を溶出させること以外は、上記(2)と同様にして His-tagged SLDH を精製した。次いで、得られた His-tagged SLDH をソルビトールと反応させた時の生成物を分析した。反応液(2 ml)組成は、10 mM (1.82 mg/ml) ソルビトール、0.1 M グリシン/NaOH 緩衝液(pH 10.1)、5 mM NADP<sup>+</sup> お

および His-tagged SLDH 0. 2 ml (41. 4  $\mu$ g 蛋白) とし、25°Cで24時間反応させた。その結果、1. 12 mg/ml のソルボースが生成した (ソルビトールは 0. 70 mg/ml 残存していた; 変換率 62%)。したがって、コバルトタイプの IMAC で精製した His-tagged SLDH は、ソルビトールを酸化してソルボースを生成するソルビトール脱水素酵素であることが確認された。

### 実施例 3 SLDH の特性解析

#### (1) 補酵素要求性および作用 pH 範囲

50 mM NAD<sup>+</sup> (または NADP<sup>+</sup>) 0. 1 ml、500 mM 緩衝液 0. 2 ml、実施例 2 の (4) で調製した His-tagged SLDH 溶液 10  $\mu$ l (2. 1  $\mu$ g 蛋白) および 蒸留水 0. 29 ml からなる溶液に、500 mM ソルビトール 0. 4 ml を添加して反応を開始し (25°C)、NADH (または NADPH) の増加を分光光度計 (UV-2200; 島津製作所) を用いて、340 nm における吸光度を指標として測定した。pH 10. 1 および pH 9. 0 の反応液はグリシン / NaOH 緩衝液を、pH 8. 0 および pH 7. 0 の反応液はリン酸カリウム緩衝液をそれぞれ使用した。酵素活性 1 単位は 1 分間に 1  $\mu$ mol の NADH (または NADPH) を生成する量と定義した。なお、NAD (P) H の分子吸光係数は 6. 3 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> とした。また、蛋白量はウシ血清アルブミン (BSA) をスタンダードとして、ローリー法で測定した。その結果、SLDH は NAD<sup>+</sup> および NADP<sup>+</sup> のいずれも補酵素として利用できるが、NADP<sup>+</sup> の方が特異性が高かった。また、該酵素の活性はアルカリ性の pH においてより高かった (表 1)。

表1

補酵素	pH	活性 (U/mg 蛋白)
NADP <sup>+</sup>	10.1	130.2
	9.0	30.0
	8.0	22.9
	7.0	4.2
NAD <sup>+</sup>	10.1	8.1
	9.0	3.4
	8.0	1.2
	7.0	0.1

## (2) 基質特異性

上記(1)の反応液において、ソルビトールを各種基質で置き換え、また緩衝液をグリシン／NaOH緩衝液(pH10.1)、補酵素をNADP<sup>+</sup>とする以外は全く同様にして、SLDH活性を測定した。その結果、本酵素はソルビトールの他、マンニトール、アラビトールを基質として利用できるが、キシリトール、リビトール、イノシトールおよびグリセロールには作用しなかった(表2)。

表2

基質	活性 (U/mg 蛋白)
ソルビトール	130.2
マンニトール	85.7
アラビトール	88.1
キシリトール	0
リビトール	0
イノシトール	0
グリセロール	0

## (3) ミカエリス定数

ソルビトールを基質として、上記(2)の方法に従ってSLDH活性を測定したところ、ソルビトールに対する $K_m$ 値は132 mM (25°C) であった。

実施例4 SNDH/SDH発現ベクターを有するシュードモナス形質転換株の作製および該形質転換株による2KLG A生産性の検討

ルイジアナ州立大学メディカルセンターの Kovach 博士から供与された広域プラスミドであるpBBR系プラスミド [Gene, 166, 175 (1995)] のうち、pBBR1MCS-2 (カナマイシン耐性) およびpBBR1MCS-3 (テトラサイクリン耐性) をベクターとして用いて、シュードモナス属株に SNDH/SDH 遺伝子を導入し、得られた形質転換体によるL-ソルボースからの2KLG Aの発酵生産について検討した。

## (1) SNDH/SDH発現広域プラスミドの構築

tuf Bをプロモーターとする SNDH/SDH 遺伝子を含むプラスミド pSDH-tuf B1-Eco-d9U (図4) 5 μg をEcoRI (ベーリンガー・マンハイム社) 50 Uで37°C、1時間消化し、0.8%アガロースゲルで電気

泳動した後、SNDH／SDH遺伝子を含む3.7kbのEcoRI／EcoRI断片を分取した。この断片をpBBR1MCS-2のEcoRI部位に挿入した。そのうち、β-ガラクトシダーゼ遺伝子と同じ方向に挿入されたプラスミドをpBBR (Km) - SDH · SNDHとした(図5)。

また、tufBをプロモーターとするSNDH／SDH遺伝子を含むプラスミドpSDH-tufB1(構築方法は欧州特許出願公開公報EP 0758679A1に記載) 10 μgをEcoRI(ベーリンガー・マンハイム社) 50Uで37°C、1時間消化した後、クレノウフラグメント(ニッポンジーン社)を用いて室温で30分間処理して末端を平滑化した。T4DNAリガーゼ(TOYOBO社)を用いて該末端にPstIリンカー(GCTGCAGC, TOYOBO社)を連結した後、PstI(ベーリンガー・マンハイム社) 50Uで37°C、1時間消化した。該消化物を0.8%アガロースゲルで電気泳動して、SNDH／SDH遺伝子を含む3.7kbのPstI／PstI断片を分取した。この断片をpBBR1MCS-3のPstI部位に挿入した。そのうち、β-ガラクトシダーゼ遺伝子と同じ方向に挿入されたプラスミドをpBBR (Tc) SDH · SNDHとした(図6)。

#### (2) シュードモナスのコンピテント細胞の調製

シュードモナス sp. F-1のグリセロール凍結保存菌体を、1%バクトリブトン(Difco社)、0.5%酵母エキス(Difco社)、1%塩化ナトリウムからなるL培地(pH 7.4) 3mlを含む16.5×165mm試験管に接種し、30°Cで一晩培養した。その培養液全量をL培地50mlを含む500ml容三角フラスコに接種し、25°Cで6時間培養した。培養液を遠心して集菌した後、冷却した10%グリセロール水溶液30mlで2回洗浄した。洗浄菌体を少量の冷却した10%グリセロール水溶液で懸濁し、60 μlずつ分注した後、液体窒素で瞬間凍結した。

#### (3) シュードモナスの形質転換

液体窒素中で凍結保存されたシュードモナス s p. F-1のコンピテント細胞を氷水中で解凍した後、上記(1)で構築したSNDH/SDH発現広域プラスミド、pBBR(Km)-SDH・SNDHおよびpBBR(Tc)-SDH・SNDHの溶液それぞれ1μl(約1μg)を加え、4°Cで30分間保持した。これをジーンバルサー遺伝子導入装置(バイオラッド社)を用い、電極間距離が0.1cmのキュベット中、200Ω、1.8kV、25μFの条件でトランスフォームした後、0.4%グルコースを含むL培地に懸濁し、30°Cで1時間振盪した。50μg/mlカナマイシンを含むL寒天プレートおよび20μg/mlテトラサイクリンを含むL寒天プレートにそれぞれ播き、30°Cで2日間培養して、形質転換株Ps. /pBBR(Km)-SDH・SNDHおよびPs. /pBBR(Tc)-SDH・SNDHを取得した。

#### (4) 形質転換株によるソルボースからの2KLGAの発酵生産

上記(3)で得られた形質転換株Ps. /pBBR(Km)-SDH・SNDHおよびPs. /pBBR(Tc)-SDH・SNDHのシングルコロニーを、5mlのL培地を含む16.5×165mm試験管にそれぞれ接種し、30°Cで2日間培養した。その培養液0.5mlを、5%ソルボース、0.1%グルコース、0.9%バクトトリプトン(Difco社)、0.45%酵母エキス(Difco社)、0.9%塩化ナトリウム、2%炭酸カルシウムからなる2KLGA生産用培地(pH7.4)10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、30°Cで5日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸を定量した。ソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸はそれぞれ以下の条件でHPLCにより定量した。

##### [ソルボース]

カラム: Polyspher OA KC (7.8mm内径×300mm;  
Cica-MERCK)

移動相: 0. 01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

カラム温度: 室温

流速: 0. 4 ml/分

検出: 示差屈折計

[ソルボソン (ポストカラムラベリング法)]

カラム: Polyspher OA KC (7. 8 mm内径×300 mm;  
Cica-MERCK)

移動相 (ラベル化剤): 0. 04 M 塩酸ベンズアミジン

0. 25 M 亜硫酸カリウム

2 mM ホウ酸/0. 1 N 水酸化カリウム

流速: 0. 3 ml/分

検出: 蛍光検知器 (励起波長: 315 nm, 検出波長 405 nm)

[2KLGAおよびL-イドン酸]

カラム: Capcell pak NH<sub>2</sub> (4. 6 mm内径×250 mm;  
資生堂)

移動相: 30%アセトニトリル, 20 mM リン酸カルシウム (pH 3. 0)

流速: 1. 2 ml/分

検出: UV-210 nm

その結果、Ps. /pBBR (Km)-SDH・SNDHのソルボースから2KLGAへの変換率は約18%、L-イドン酸への変換率を合わせると約37%であった。また、Ps. /pBBR (Tc)-SDH・SNDHのソルボースから2KLGAへの変換率は約26%、L-イドン酸への変換率を合わせると約47%であった (表3)。

表 3

## 形質転換株の培養結果 (mg/ml)

形質転換株	ソルボース	ソルボソン	2KLGA	L-イドン酸
<i>Ps./pBBR(Km)-SDH·SNDH</i>	12.5 (25.0)	0.3 (0.6)	8.9 (17.8)	9.6 (19.6)
<i>Ps./pBBR(Tc)-SDH·SNDH</i>	15.6 (31.2)	0.15(0.3)	13 (26.0)	10.3(20.6)

括弧内の数値は変換率（初期ソルボース濃度に対する生成物濃度の%）を表す。

比較のために、非形質転換株シードモナス s p. F-1の2KLGAおよびL-イドン酸生産についても調べた。シードモナス s p. F-1のグリセロール凍結保存菌体を、5mlのL培地を含む16.5×165mm試験管に接種し、30°Cで1日間培養した。その培養液1mlを5%ソルボース、0.9%バクトトリプトン(Difco社)、0.45%酵母エキス(Difco社)、0.9%塩化ナトリウムからなる培地(pH 7.4)10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、30°Cで3日間培養した。培養液を遠心分離し、同様に培養上清中のソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸を定量した。その結果、ソルボースは5.7mg/mlと消費されていたが、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸は検出されなかった。

以上より、2KLGAおよびL-イドン酸非生産性のシードモナス s p. F-1にSNDH/SDH遺伝子を導入することにより、ソルボースから2KLGAおよびL-イドン酸を高生産する形質転換株を得ることができた。

**実施例5 SNDH/SDH発現ベクターを有するシードモナス形質転換株の作製および該形質転換株による2KLGA生産性の検討(2)**

実施例4と同様にして、シードモナス属に属する別の菌株(シードモナスIFO3309株;(財)発酵研究所(大阪市淀川区十三本町2-17-85)より分与を受けた)を宿主として、SNDH/SDH遺伝子を導入した形質転換株

を作製し、該形質転換株における 2 K L G A および L-イドン酸生産性を調べた。

(1) シュードモナス I F O 3 3 0 9 株への S N D H / S D H 遺伝子の導入

シュードモナス I F O 3 3 0 9 株のグリセロール凍結保存菌体を、実施例 4 の

(2) と同様の方法で処理し、コンピテント細胞の凍結保存菌体を調製した。液体窒素中で凍結保存された該コンピテント細胞を氷水中で解凍した後、 S N D H / S D H 発現広域プラスミドである P s. / p B B R (Km) - S D H · S N D H の溶液 1  $\mu$  l (約 1  $\mu$  g) を加え、4 °Cで 30 分間保持した。これをジーンパルサー遺伝子導入装置 (バイオラッド社) を用い、実施例 4 の (3) と同様の条件で形質転換して、形質転換株 P s. I F O 3 3 0 9 / p B B R (Km) - S D H · S N D H を取得した。

(2) 形質転換株における 2 K L G A の発酵生産

上記 (1) で得られた P s. I F O 3 3 0 9 / p B B R (Km) - S D H · S N D H の 1 白金耳を、2 %ソルビトール、0. 5 %酵母エキス (D i f c o 社) からなる培地 (pH 7. 0) 5 ml を含む 16. 5 × 165 mm 試験管に接種し、28 °Cで 1 日間培養した。その培養液 1 ml を 5 %ソルビトール、0. 5 %酵母エキス (D i f c o 社)、0. 2 %ポリペプトン (和光純薬)、0. 1 %K<sub>2</sub> H P O<sub>4</sub>、0. 5 %Mg S O<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub> O、2 %C a C O<sub>3</sub> からなる培地 (pH 7. 0) 10 ml を含む 100 ml 容三角フラスコに接種し、28 °Cで 7 日間培養した。培養液を遠心分離し、実施例 4 の (4) と同様にして培養上清中のソルビトール、ソルボース、ソルボソン、2 K L G A および L-イドン酸を定量した。比較のために、非形質転換株シュードモナス I F O 3 3 0 9 株を同じ条件で培養し、培養上清中のソルビトール、ソルボース、ソルボソン、2 K L G A および L-イドン酸を定量した。

その結果、非形質転換株では、ソルビトールは 0. 4 mg / ml と消費され、ソルボースは 3. 9 mg / ml と生産していたが、ソルボソン、2 K L G A および L-イドン酸は検出されなかった。一方、形質転換株 P s. I F O 3 3 0 9 /

pBBR (Km) - SDH・SNDHでは、1. 2 mg/mlの2KLGAと、0. 5 mg/mlのL-イドン酸を生産していた（表4）。すなわち、シュードモナスIFO3309が2KLGAおよびL-イドン酸を生産できない条件下でも、SNDH/SDH遺伝子を該宿主に導入することにより、ソルビトールから2KLGAおよびL-イドン酸を生産する能力が付与されることが確認された。

表4

形質転換株の培養結果 (mg/ml)

形質転換株	ソルボース	ソルボソン	2KLGA	L-イドン酸
Ps.3309/pBBR(Km)-SDH・SNDH	0.41	1.8	1.2	0.5

実施例6 SLDH発現ベクターおよびSNDH/SDH発現ベクターを導入したシュードモナス形質転換株による2KLGAの製造

(1) SLDH発現ベクターおよびSNDH/SDH発現ベクターを有するシュードモナス形質転換株の作製

上述のように、pBBR1MCS-2にG. オキシダンスT-100 (FERM BP-4188; 欧州特許出願公開公報EP 0758679 A1) 由來のSNDH/SDH遺伝子を組み込んだ発現ベクターpBBR (Km) - SDH・SNDH (図5) を構築した。実施例1の(5)で得られた組換えシュードモナスPs. /pUCP19-B7SX2に、pBBR (Km) - SDH・SNDHをエレクトロポーレーション法を用いて導入し、Ps. /pUCP19-B7SX2+pBBR (Km) - SDH・SNDHを得た。

(2) シュードモナス形質転換株による2KLGAの生産

Ps. /pUCP19-B7SX2+pBBR (Km) - SDH・SNDHを、5%ソルビトール、1%バクトリプトン (Difco社)、0.5%酵母エキス (Difco社)、1%塩化ナトリウム、50 μg/mlアンビシリン、50 μg

/ml カナマイシン、2% 軽質炭酸カルシウムからなる培地 (pH 7.4) で 30°C、4 日間培養したところ、1.1 mg/ml の 2KLGA と 1.7 mg/ml の イドン酸が得られた。2KLGA については、HPLC で分取し、標品との保持時間の一致を確認した。さらに、GC/MS を用いて、標品とのマスバター ンの一致を確認した。HPLC および GC/MS はそれぞれ実施例 1 の (3) および (5) と同様の条件で行った。

#### 実施例 7 種々のシュードモナス形質転換株の作製

(1) Ps. /pUCP19-SLDH+pBBR (Km) - SDH · SNDH  
実施例 2 の (1) で構築した pUCP19-SLDH でシュードモナス sp. F-1 を形質転換して Ps. /pUCP19-SLDH を得た。該組換えシュー ドモナスにさらに pBBR (Km) - SDH · SNDH を導入して、Ps. /pUCP19-SLDH+pBBR (Km) - SDH · SNDH を得た。

(2) Ps. /pUCP19-SLDH-tufB+pBBR (Km) - SDH · SNDH

SLDH 遺伝子の開始コドンの上流に SspI 部位を導入するために、pUCP19-SLDH (5 μg) をテンプレートとして、下記プライマー (各 20 pmol) 存在下で、pfu DNA ポリメラーゼ (2.5 U) を用いて PCR を行った (94°C, 30 秒 → 55°C, 2 分 → 72°C, 2 分, 25 サイクル)。

センスプライマー [SspI 部位 (下線部) および SLDH コーディング配列 の 5' 末端と一致する配列を含む]

TAGGAATATTCTCATGATTACGCGCGAAACCC (配列表配列番号 19)

アンチセンスプライマー [SLDH コーディング配列内の EagI 部位の下流 の配列と一致する配列]

GATGCTTCAGCACGGC (配列表配列番号 20)

PCR で特異的に増幅した約 360 bp の断片を SspI と EagI で消化し

た。また、pUCP19-SLDHをPstIとEagIで消化し、約5.7kbの断片を得た。これら2つの断片とtufBプロモーターを含むPstI-SpI断片（配列表配列番号21）をT4DNAリガーゼで連結し、pUCP19-SLDH-tufBを構築した。そして、このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、Ps./pUCP19-SLDH-tufBを得た。さらに、SDH/SDH活性を発現するpBBR(Km)-SDH・SNDHを導入し、Ps./pUCP19-SLDH-tufB+pBBR(Km)-SDH・SNDHを得た。

### (3) Ps./pUCP19-3DH

5μgのpUCP19-SLDH-tufBを40UのKpnIと40UのPstIで37°C、1時間消化し、1.6kb断片を得た。また、1μgのpUCP19-SDH・SNDH（pUCP19にG.オキシダンスT-100由来のSNDH/SDH遺伝子を組み込んだ発現ベクター；図7）を10UのKpnIと10UのPstIで37°C、1時間消化し、8.2kbの断片を得た。これら2つの断片をT4DNAリガーゼで連結し、pUCP19-3DHを構築した。そして、このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、Ps./pUCP19-3DHを得た。

### 実施例8 2KLGAの生産性の検討

組換えシュードモナスによる2KLGAの生産が確認できたので、実施例6および7で得られた4種の形質転換株を用いて、種々の組成の培地での2KLGAの生産性を検討した。

#### [培養1]

1%バクトリプトン（Difco社）、0.5%酵母エキス（Difco社）、1%NaCl、50μg/mlアンビシリン、50μg/mlカナマイシンからなる培地（pH7.4）2mlを含む15ml容チューブ（ファルコン社）に、

P s. / p U C P 1 9 - B 7 S X 2 + p B B R (Km) - S D H · S N D H の凍結保存菌体の 1 白金耳を植菌し、30°Cで 24 時間前培養した。前培養液 0.5 ml を、5% ソルビトール、5% 酵母エキス (D i f c o 社)、0.15% Mg SO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O、50 μg/ml アンビシリン、50 μg/ml カナマイシン、4% 炭酸カルシウムからなる本培養培地 (pH 7.0) 10 ml を含む 100 ml 容三角フラスコに植菌し、30°Cで 3 日間培養した。

#### [培養 2]

本培養培地の 5% 酵母エキスを 5% カザミノ酸に変えた以外は、[培養 1] と同様にして培養した。

#### [培養 3]

本培養培地に 1% グリセロールをさらに添加した以外は、[培養 1] と同様にして培養した。

#### [培養 4]

生産菌として P s. / p U C P 1 9 - S L D H + p B B R (Km) - S D H · S N D H を用い、本培養培地に 5% グリセロールをさらに添加した以外は、[培養 1] と同様にして培養した。

#### [培養 5]

生産菌として P s. / p U C P 1 9 - S L D H - t u f B + p B B R (Km) - S D H · S N D H を用い、本培養培地に 5% グリセロールを添加した以外は、[培養 1] と同様にして培養した。

#### [培養 6]

生産菌として P s. / p U C P 1 9 - 3 D H を用い、前培養培地と本培養培地からカナマイシンを除き、さらに本培養培地に 5% グリセロールを添加した以外は、[培養 1] と同様にして培養した。

各培養におけるソルビトール、ソルボース、ソルボソンおよび 2 K L G A を定量した。その結果を表 5 に示す。培地にグリセロールを添加することにより 2 K

LGAへの変換率が向上する傾向が認められた。

[培養7]

本培養培地の酵母エキス濃度を2%とし、さらに5%グリセロールを添加した以外は、[培養1]と同様の条件で、7日間培養した。培養1, 3, 5および7日目におけるソルビトール、ソルボース、ソルボソンおよび2KLGAを定量した。結果を表5に示す。

表5

培養	ソルビトール	ソルボース	ソルボソン	2KLGA	イドン酸
1	44.1	6.3	0.1	3.7	1.6
2	44.8	3.1	0	4.8	2.2
3	26.7	5.1	0	10.9	8.4
4	26.6	0	0	9.0	ND
5	26.6	0	0	10.7	ND
6	30.7	5.2	0	7.5	ND
日数	ソルビトール	ソルボース	ソルボソン	2KLGA	イドン酸
1	41.1	0	0	4.2	ND
3	25.6	0	0	10.6	ND
5	14.2	0	0	16.3	ND
7	7.6	0	0	18.4	15.5

(単位: mg/ml)

ND: 定量していない

実施例9 SLDH発現ベクターおよび/またはSNDH/SDH発現ベクターを導入したシードモナス・ブチーダ形質転換株によるソルボースまたは2KL

### G Aの発酵生産

以下の実験において、シュードモナス・ブチーダIFO 3738株のコンピメント細胞の調製および形質転換は、上記シュードモナス sp. F-1と同様にして行った。但し、シュードモナス・ブチーダIFO 3738株はアンビシリン耐性のため、選択マーカーとしてアンビシリン耐性を用いる場合には、エレクトロポレーション後、500  $\mu$ g/mlアンビシリン（通常の10倍量）を含むL寒天プレートに細胞を播き、30°Cで1日培養して、コロニーの大きいものをピックアップすることにより、形質転換体を選択した。

#### (1) SLDH発現ベクターを導入した形質転換株によるソルビトールからのソルボースの発酵生産

シュードモナス・ブチーダIFO 3738株にSLDH遺伝子（pUCP19-SLDH）を導入した。得られた形質転換株シュードモナス・ブチーダIFO 3738/pUCP19-SLDHのシングルコロニーを、5%ソルビトール、0.9%バクトリプトン（Difco社）、0.45%酵母エキス（Difco社）、0.9%塩化ナトリウムおよび500  $\mu$ g/mlアンビシリンからなるソルボース生産用培地（pH 7.4）10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、30°Cで3日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルビトールおよびソルボースを定量した。その結果、34.6 mg/mlのソルビトールが残存し、7.6 mg/mlのソルボースが生成した。

#### (2) SNDH/SDH発現ベクターを導入した形質転換株によるソルボースからの2KLG Aの発酵生産

シュードモナス・ブチーダIFO 3738にSNDH/SDH遺伝子（pBBR (Km)-SDH・SNDH）を導入した。得られた形質転換株シュードモナス・ブチーダIFO 3738/pBBR (Km)-SDH・SNDHのシングルコロニーを、5%ソルボース、0.9%バクトリプトン（Difco社）、0.45%酵母エキス（Difco社）、0.9%塩化ナトリウム、2%炭酸カルシウム

ムおよび $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンからなる2KLGA生産用培地(pH 7.4)10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、30°Cで7日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルボース、2KLGAおよびイドン酸を定量した。その結果、34.3mg/mlのソルボースが残存し、13.9mg/mlの2KLGAおよび3.5mg/mlのイドン酸が生成した。

(3) SLDH発現ベクターおよびSNDH/SDH発現ベクターを導入した形質転換株によるソルビトールからの2KLGAの発酵生産

シュードモナス・ブチーダIFO 3738株にSLDHおよびSNDH/SDH遺伝子(pUCP19-SLDHおよびpBBR(Km)-SDH・SNDH)を導入した。得られた形質転換株シュードモナス・ブチーダIFO 3738/pUCP19-SLDH+pBBR(Km)-SDH・SNDHのシングルコロニーを、5%ソルビトール、0.9%バクトリプトン(Difco社)、0.45%酵母エキス(Difco社)、0.9%塩化ナトリウム、2%炭酸カルシウム、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンビシリンおよび50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンからなる2KLGA生産用培地(pH 7.4)10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、30°Cで7日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルビトール、ソルボース、2KLGAおよびイドン酸を定量した。その結果、35.6mg/mlのソルビトールが残存し、13.2mg/mlの2KLGAおよび6.2mg/mlのイドン酸が生成した。ソルボースは検出されなかった。

#### 配列リストのフリーテキスト

配列番号3:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号4:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号5:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマ

ーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号6：pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号7：pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号8：pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号9：pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号10：pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号11：pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号12：pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号13：pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号14：His-tagged SLDH およびプロモーターをコードするDNA配列を増幅するためのセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号15：His-tagged SLDH およびプロモーターをコードするDNA配列を増幅するためのアンチセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号16：SLDH遺伝子の3'非コーディング領域のDNA配列を増幅するためのセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号17：SLDH遺伝子の3'非コーディング領域のDNA配列を増幅するためのアンチセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号18：SLDHのN末端アミノ酸配列。

配列番号19：SLDHコーディング配列の5'上流領域にSspI制限部位を導入するためのPCRプライマー（センス）として働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号20：SLDHコーディング配列の5'上流領域にSspI制限部位を導入するためのPCRプライマー（アンチセンス）として働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

本出願は日本で出願された平成11年特許願第72810号および平成11年特許願第224679号を基礎としており、その内容は本明細書にすべて含まれるものである。

また、本明細書において引用された特許および特許出願を含む文献は、引用したことによってその内容のすべてが開示されたと同程度に本明細書中に組み込まれるものである。

## 請 求 の 範 囲

1. 下記の理化学的性質を有するソルビトールデヒドロゲナーゼ。

(a) 作用: D-ソルビトールを L-ソルボースに変換する反応を触媒する

(b) 分子量: 約 54 kDa

(c) 補酵素: NAD (P)<sup>+</sup> 依存性

(d) 基質特異性: ソルビトール、マンニトール、アラビトールを特異的に酸化し、キシリトール、リビトール、イノシトール、グリセロールに作用しない

2. グルコノバクター・オキシダンス G 624 株由来である請求項 1 記載のソルビトールデヒドロゲナーゼ。

3. 請求項 2 記載のソルビトールデヒドロゲナーゼと分子進化上、同一の遺伝子を起源とするソルビトールデヒドロゲナーゼ。

4. グルコノバクター属に属する細菌由来である請求項 3 記載のソルビトールデヒドロゲナーゼ。

5. 以下の(a)または(b)の蛋白質であるソルビトールデヒドロゲナーゼ。

(a) 配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 上記(a)のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾されたアミノ酸配列からなり、且つ D-ソルビトールを L-ソルボースに変換する反応を触媒する蛋白質

6. 請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のソルビトールデヒドロゲナーゼをコードする DNA。

7. 以下の(a)または(b)の DNA である請求項 6 記載の DNA。

(a) 配列表配列番号 2 に示される塩基配列中塩基番号 537 ~ 1991 で示される塩基配列からなる DNA

(b) 上記(a)の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る DNA

8. グルコノバクター属に属する細菌由来である請求項 6 または 7 記載の DNA。

9. 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列からなるDNAおよびその部分DNAとハイブリダイズし得るDNAであって、ソルビトールデヒドロゲナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。

10. 請求項9記載の遺伝子によってコードされ、ソルビトールデヒドロゲナーゼ活性を有するグルコノバクター属由來の蛋白質。

11. 以下の(a)または(b)のDNAからなるプロモーター遺伝子。

(a) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号1～536で示される塩基配列からなるDNA

(b) 上記(a)の塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾された塩基配列からなり、且つ少なくとも1種の微生物においてプロモーター活性を有するDNA

12. 請求項6～9のいずれかに記載のDNAを含む組換えベクター。

13. 請求項6～9のいずれかに記載のDNAを含む発現ベクター。

14. ソルボースデヒドロゲナーゼをコードするDNAおよび/またはソルボソンデヒドロゲナーゼをコードするDNAをさらに含む請求項13記載の発現ベクター。

15. 請求項13または14記載の発現ベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

16. 大腸菌、シュードモナス属、グルコノバクター属、アセトバクター属およびシュードグルコノバクター属からなる群より選択される属に属する請求項15記載の形質転換体。

17. D-ソルビトールを2-ケト-L-グロン酸に変換する能力を有する請求項15または16記載の形質転換体。

18. 請求項13記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から請求項1～5のいずれかに記載のソルビトールデヒドロ

ゲナーゼまたは請求項 10 記載の蛋白質を採取することを含むソルビトールデヒドロゲナーゼ活性を有する蛋白質の製造方法。

19. 請求項 13 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含むL-ソルボースの製造方法。

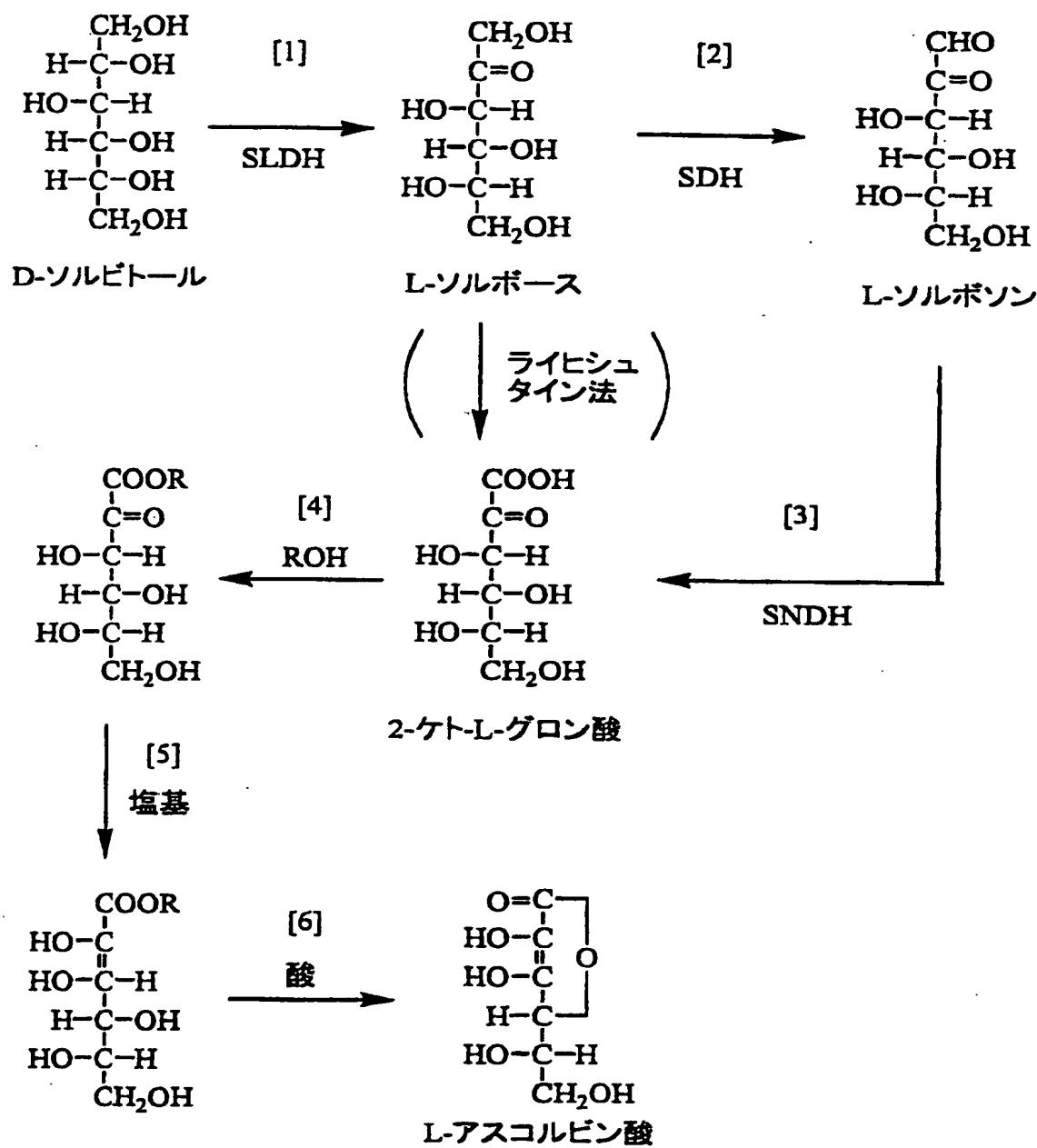
20. ソルボースデヒドロゲナーゼをコードするDNAおよびソルボソンデヒドロゲナーゼをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に請求項 19 記載の方法により得られるL-ソルボースを接触させる工程を含む2-ケト-L-グロン酸の製造方法。

21. 請求項 17 記載の形質転換体を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含む2-ケト-L-グロン酸の製造方法。

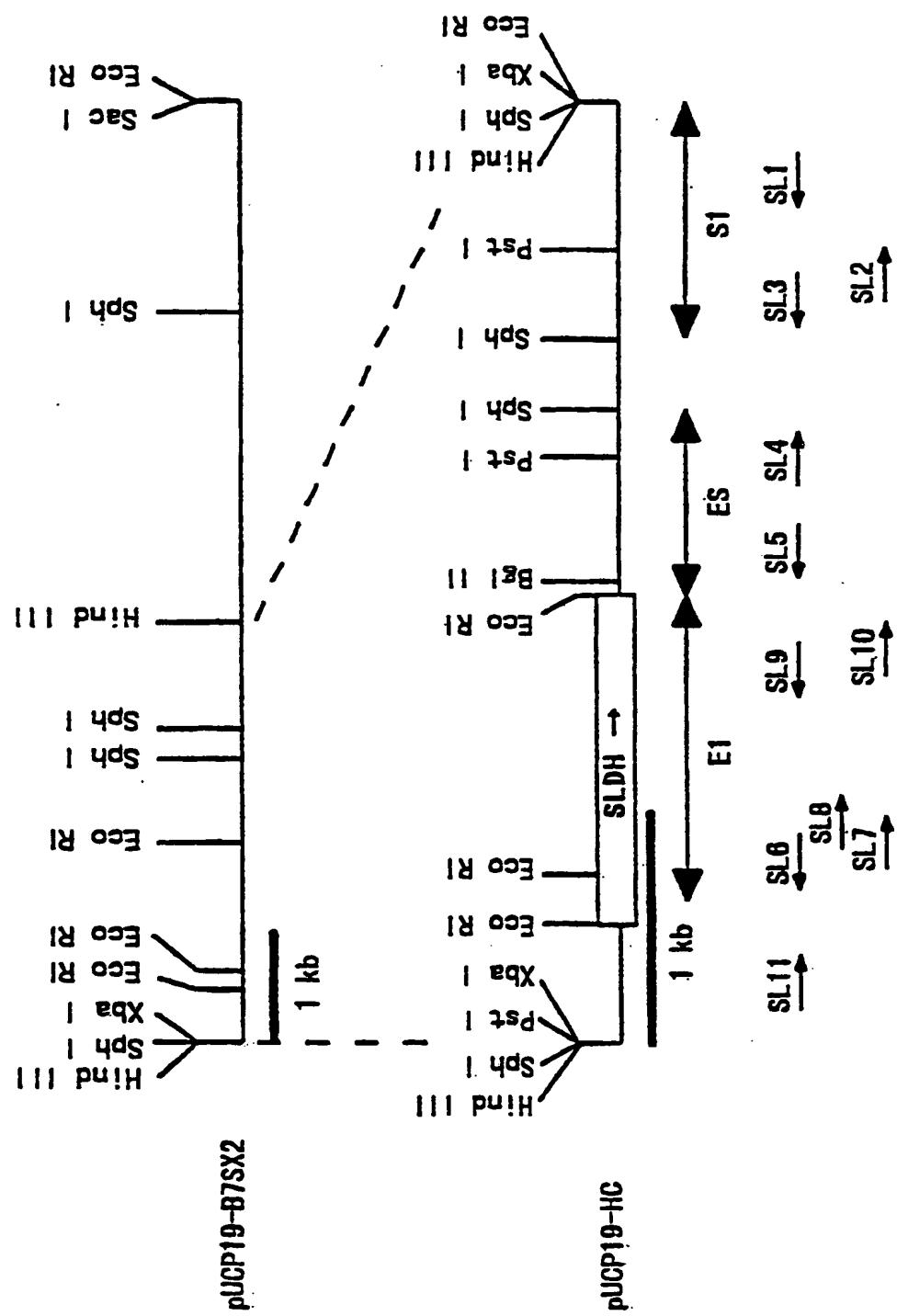
22. 請求項 20 または 21 記載の方法により得られる2-ケト-L-グロン酸を、L-アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩に変換する工程を含む、L-アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩の製造方法。

1/7

## 第 1 図

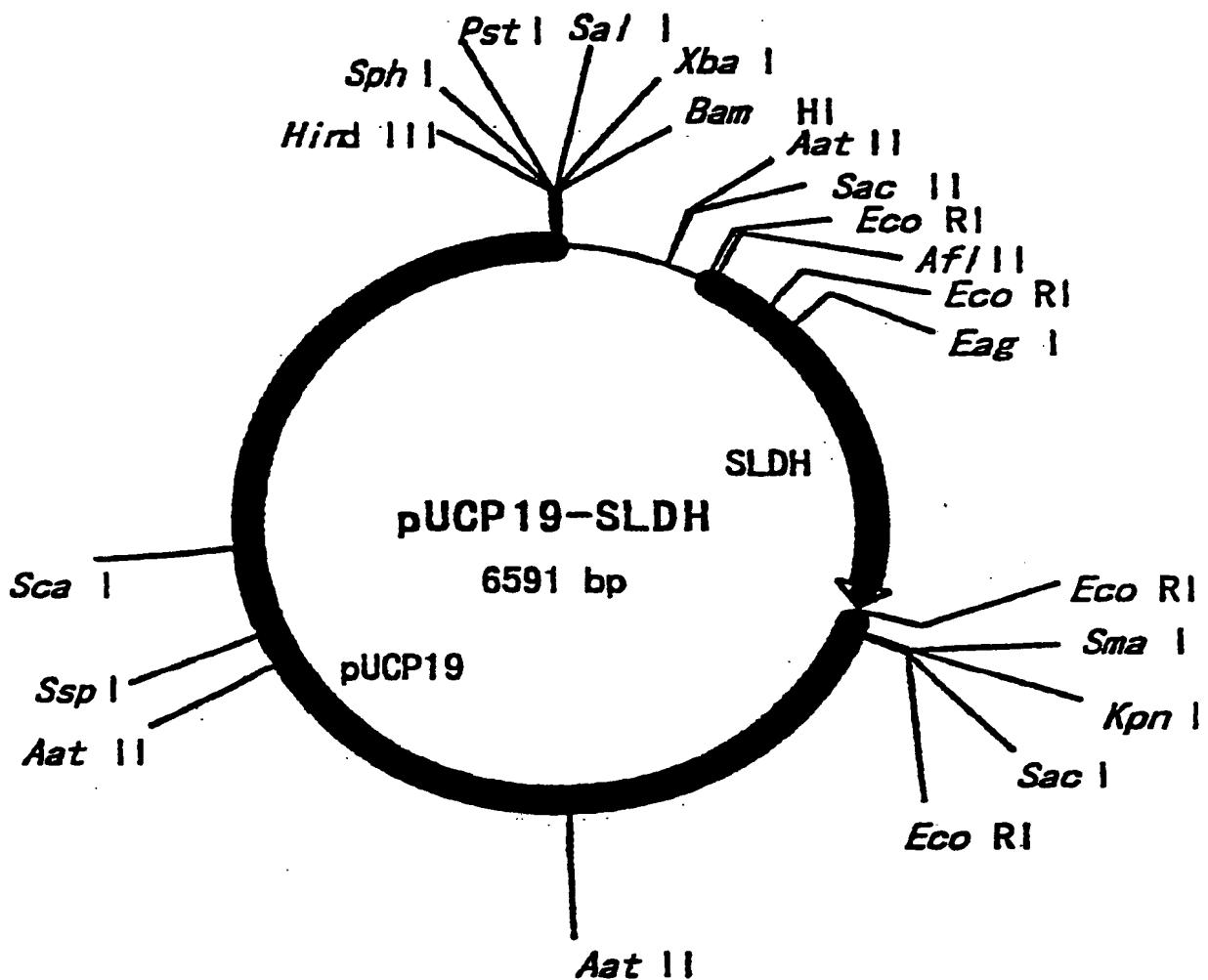


## 第2回



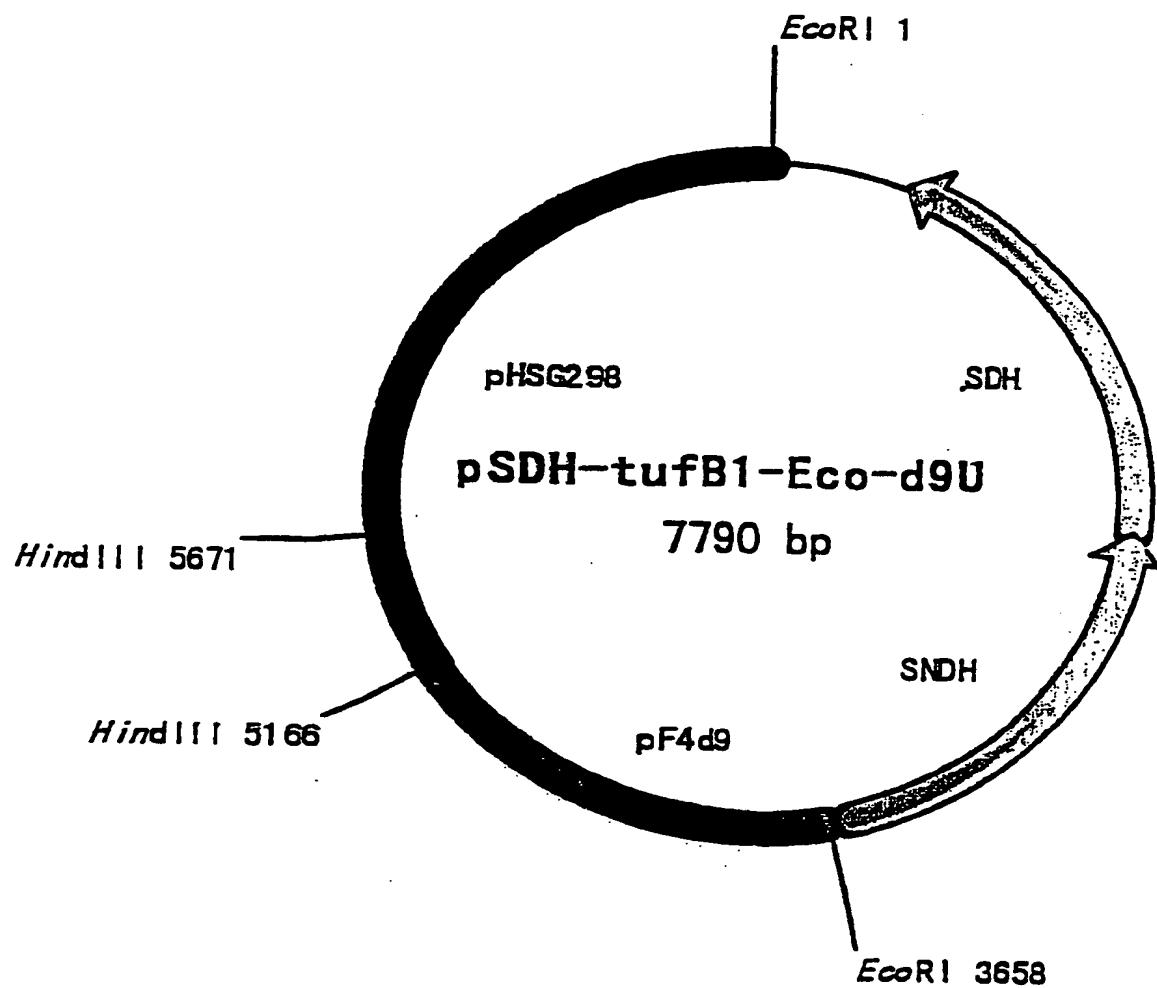
3/7

## 第3図



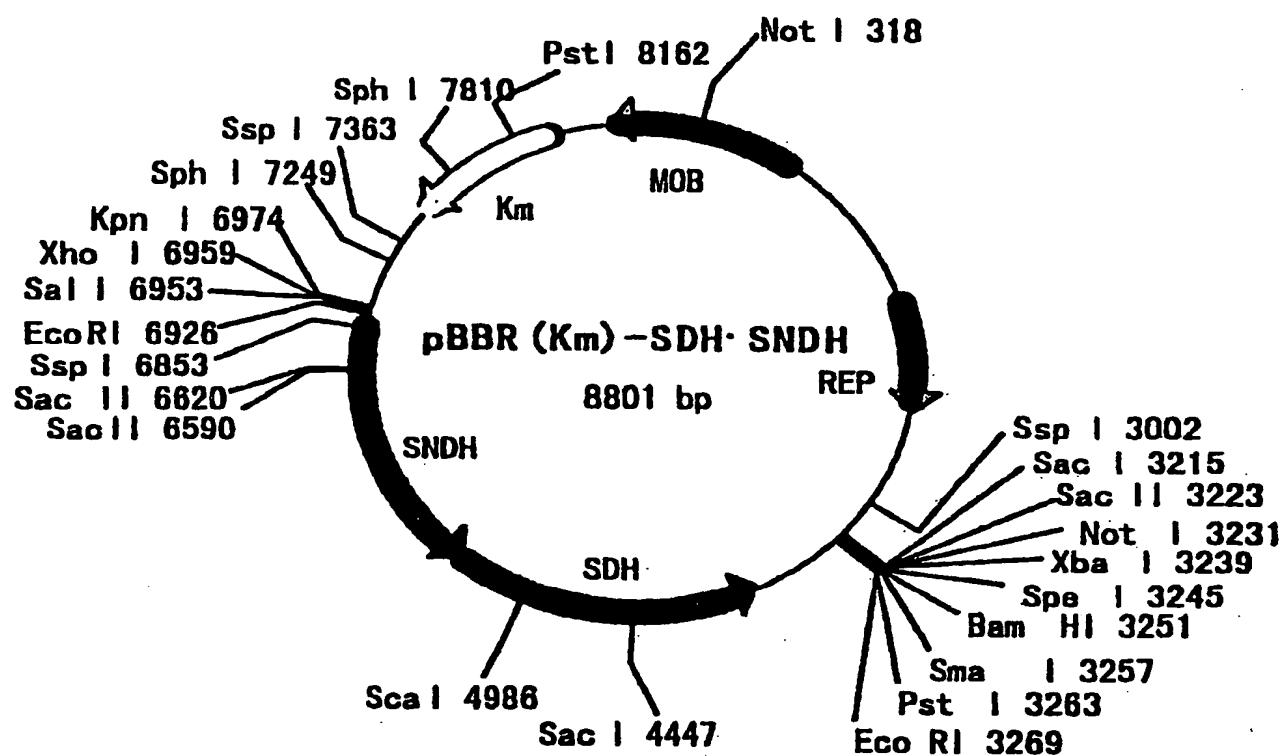
4/7

## 第4図

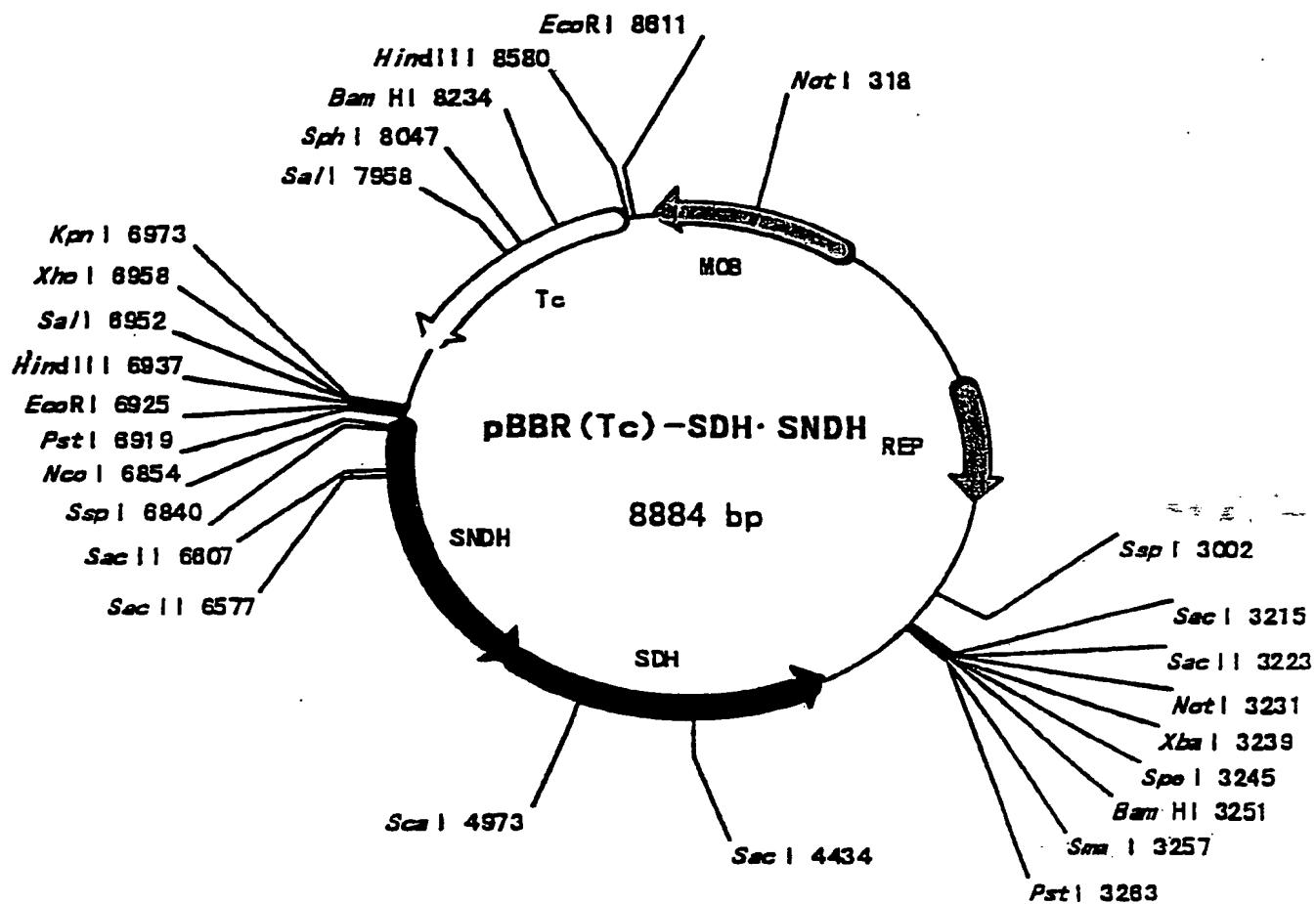


5/7

## 第5図

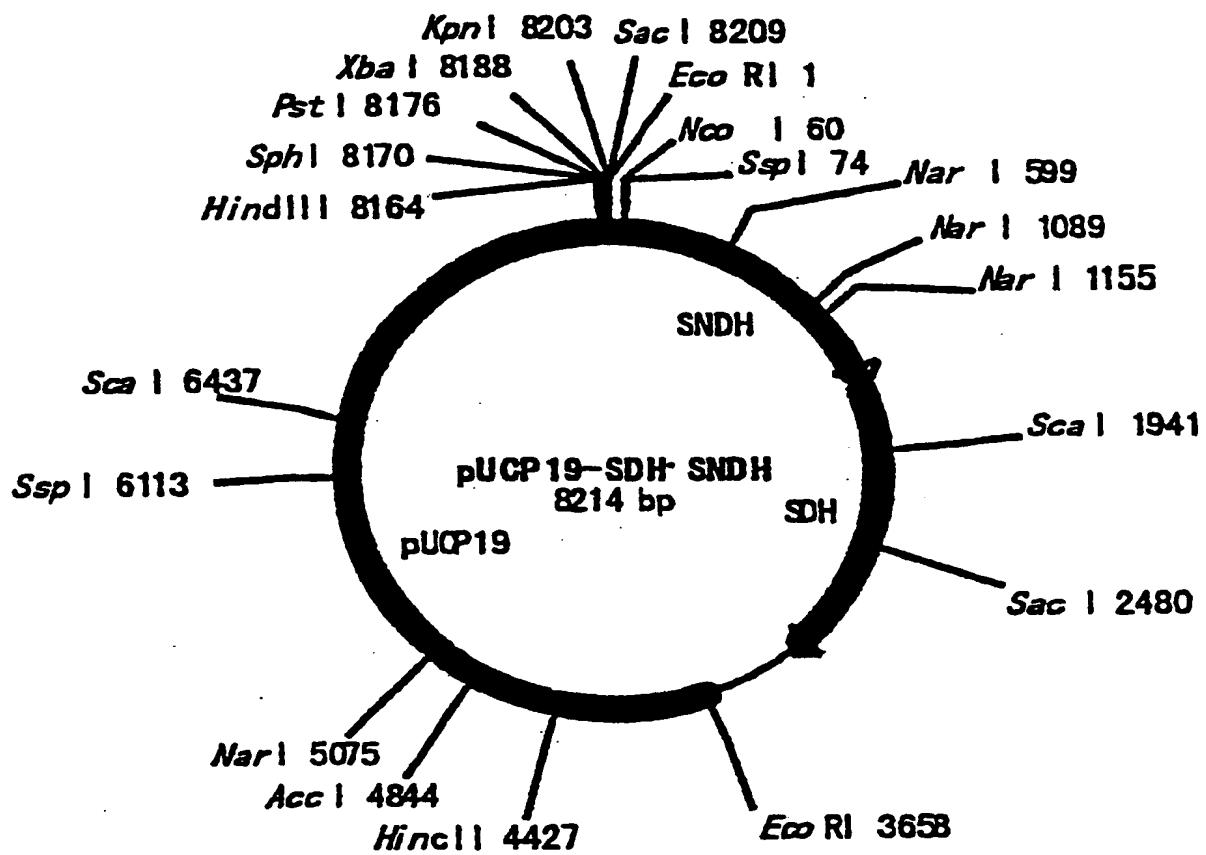


## 第6図



7/7

## 第7図



## SPECIMEN SEQUENCE LISTING

<110> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Sorbitol Dehydrogenase, Gene Coding Thereof and Use Thereof

<130> 09348

<150> JP 11-72810

<151> 1999-03-17

<150> JP 11-224679

<151> 1999-08-06

<160> 20

<210> 1

<211> 485

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<400> 1

Met Ile Thr Arg Glu Thr Leu Lys Ser Leu Pro Ala Asn Val Gln Ala  
1 5 10 15

Pro Pro Tyr Asp Ile Asp Gly Ile Lys Pro Gly Ile Val His Phe Gly  
20 25 30

Val Gly Asn Phe Phe Arg Ala His Glu Ala Phe Tyr Val Glu Gln Ile  
35 40 45

Leu Glu His Ala Pro Asp Trp Ala Ile Val Gly Val Gly Leu Thr Gly  
50 55 60

Ser Asp Arg Ser Lys Lys Lys Ala Glu Glu Phe Lys Ala Gln Asp Cys  
65 70 75 80

Leu Tyr Ser Leu Thr Glu Thr Ala Pro Ser Gly Lys Ser Thr Val Arg  
85 90 95

Val Met Gly Ala Leu Arg Asp Tyr Leu Leu Ala Pro Ala Asp Pro Glu  
100 105 110

Ala Val Leu Lys His Leu Val Asp Pro Ala Ile Arg Ile Val Ser Met  
115 120 125

Thr Ile Thr Glu Gly Gly Tyr Asn Ile Asn Glu Thr Thr Gly Ala Phe  
130 135 140

2/12

Asp Leu Glu Asn Ala Ala Val Lys Ala Asp Leu Lys Asn Pro Glu Lys  
 145 150 155 160  
 Pro Ser Thr Val Phe Gly Tyr Val Val Glu Ala Leu Arg Arg Arg Trp  
 165 170 175  
 Asp Ala Gly Gly Lys Ala Phe Thr Val Met Ser Cys Asp Asn Leu Arg  
 180 185 190  
 His Asn Gly Asn Val Ala Arg Lys Ala Phe Leu Gly Tyr Ala Lys Ala  
 195 200 205  
 Arg Asp Pro Glu Leu Ala Lys Trp Ile Glu Glu Asn Ala Thr Phe Pro  
 210 215 220  
 Asn Gly Met Val Asp Arg Ile Thr Pro Thr Val Ser Ala Glu Ile Ala  
 225 230 235 240  
 Lys Lys Leu Asn Ala Ala Ser Gly Leu Asp Asp Asp Leu Pro Leu Val  
 245 250 255  
 Ala Glu Asp Phe His Gln Trp Val Leu Glu Asp Gln Phe Ala Asp Gly  
 260 265 270  
 Arg Pro Pro Leu Glu Lys Ala Gly Val Gln Met Val Gly Asp Val Thr  
 275 280 285  
 Asp Trp Glu Tyr Val Lys Ile Arg Met Leu Asn Ala Gly His Val Met  
 290 295 300  
 Leu Cys Phe Pro Gly Ile Leu Val Gly Tyr Glu Asn Val Asp Asp Ala  
 305 310 315 320  
 Ile Glu Asp Ser Glu Leu Leu Gly Asn Leu Lys Asn Tyr Leu Asn Lys  
 325 330 335  
 Asp Val Ile Pro Thr Leu Lys Ala Pro Ser Gly Met Thr Leu Glu Gly  
 340 345 350  
 Tyr Arg Asp Ser Val Ile Ser Arg Phe Ser Asn Lys Ala Met Ser Asp  
 355 360 365  
 Gln Thr Leu Arg Ile Ala Ser Asp Gly Cys Ser Lys Val Gln Val Phe  
 370 375 380  
 Trp Thr Glu Thr Val Arg Arg Ala Ile Glu Asp Lys Arg Asp Leu Ser  
 385 390 395 400  
 Arg Ile Ala Phe Gly Ile Ala Ser Tyr Leu Glu Met Leu Arg Gly Arg  
 405 410 415  
 Asp Glu Lys Gly Gly Thr Tyr Glu Ser Ser Glu Pro Thr Tyr Gly Asp  
 420 425 430  
 Ala Glu Trp Lys Leu Ala Lys Ala Asp Asp Phe Glu Ser Ser Leu Lys  
 435 440 445  
 Leu Pro Ala Phe Asp Gly Trp Arg Asp Leu Asp Thr Ser Glu Leu Asp  
 450 455 460



4/12

	70	75	80	
tat tcc ctg acc gag acg gct ccg tcc ggc aag	acg acg gtg cgc gtc			827
Tyr Ser Leu Thr Glu Thr Ala Pro Ser Gly Lys	Ser Thr Val Arg Val			
85	90	95		
atg ggc gcg ctg cgt gac tat ctg ctt gcc ccg	gat ccg gaa gcc			875
Met Gly Ala Leu Arg Asp Tyr Leu Ala Pro Ala	Asp Pro Glu Ala			
100	105	110		
gtg ctg aag cat ctt gtt gat ccg gcc atc cgc	atc gtt tcc atg acg			923
Val Leu Lys His Leu Val Asp Pro Ala Ile Arg	Ile Val Ser Met Thr			
115	120	125		
atc acg gaa ggc ggc tac aac atc aac gag acg	acc ggt gcg ttc gat			971
Ile Thr Glu Gly Gly Tyr Asn Ile Asn Glu Thr	Thr Gly Ala Phe Asp			
130	135	140	145	
ctg gag aat gcg gca gta aag gcc gac ctc aag	aac ccg gaa aag ccg			1019
Leu Glu Asn Ala Ala Val Lys Ala Asp Leu Lys	Asn Pro Glu Lys Pro			
150	155	160		
tct acc gtt ttc ggt tac gtg gtc gag gcc	ctg cgt cgt tgg gat			1067
Ser Thr Val Phe Gly Tyr Val Val Glu Ala Leu	Arg Arg Arg Trp Asp			
165	170	175		
gcc ggt ggt aag gca ttt acg gtc atg tcc	tgt gat aac ctg cgt cat			1115
Ala Gly Gly Lys Ala Phe Thr Val Met Ser Cys	Asp Asn Leu Arg His			
180	185	190		
aac ggc aat gtc gcc cgc aag gcc ttc ctc	ggc tat gcg aag gcg cgc			1163
Asn Gly Asn Val Ala Arg Lys Ala Phe Leu	Gly Tyr Ala Lys Ala Ala			
195	200	205		
gat ccg gag ttg gcg aag tgg att gag gaa	aac gcg acc ttc ccg aac			1211
Asp Pro Glu Leu Ala Lys Trp Ile Glu Glu Asn	Ala Thr Phe Pro Asn			
210	215	220	225	
gga atg gtt gat cgc atc acc ccg acc gtt	tgc gcg gaa atc gcc aag			1259
Gly Met Val Asp Arg Ile Thr Pro Thr Val Ser	Ala Glu Ile Ala Lys			
230	235	240		
aag ctc aac gcg gcc agt ggg ctg gat gac	gac ctg ccg ctg gtg gcc			1307
Lys Leu Asn Ala Ala Ser Gly Leu Asp Asp Leu	Pro Leu Val Ala			
245	250	255		
gag gat ttc cat cag tgg gtg ctg gaa gac	cag ttt gcg gat ggc cgt			1355
Glu Asp Phe His Gln Trp Val Leu Glu Asp Gln	Phe Ala Asp Gly Arg			
260	265	270		
ccg ccg ctt gaa aaa gcc ggc gtg cag atg	gtc ggg gac gtg acg gac			1403
Pro Pro Leu Glu Lys Ala Gly Val Gln Met Val	Gly Asp Val Thr Asp			
275	280	285		

5/12

tgg gag tac gtc aag atc cga atg ctc aat gca ggg cat gtc atg ctc	1451
Trp Glu Tyr Val Lys Ile Arg Met Leu Asn Ala Gly His Val Met Leu	
290 295 300 305	
tgc ttc cca ggc att ctg gtc ggc tat gag aat gtg gat gac gcc att	1499
Cys Phe Pro Gly Ile Leu Val Gly Tyr Glu Asn Val Asp Asp Ala Ile	
310 315 320	
gaa gac agc gaa ctc ctt ggc aat ctg aag aac tat ctc aac aag gat	1547
Glu Asp Ser Glu Leu Leu Gly Asn Leu Lys Asn Tyr Leu Asn Lys Asp	
325 330 335	
gtc atc ccg acc ctg aag gcg cct tca ggc atg acg ctc gaa ggc tat	1595
Val Ile Pro Thr Leu Lys Ala Pro Ser Gly Met Thr Leu Glu Gly Tyr	
340 345 350	
cgg gac agc gtc atc agc cgt ttc tcc aac aag gcg atg tcg gac cag	1643
Arg Asp Ser Val Ile Ser Arg Phe Ser Asn Lys Ala Met Ser Asp Gln	
355 360 365	
acg ctc cgg att gct agc gat ggc tgt tcc aag gtt cag gtg ttc tgg	1691
Thr Leu Arg Ile Ala Ser Asp Gly Cys Ser Lys Val Gln Val Phe Trp	
370 375 380 385	
acg gaa acc gtg cgt cgg gcg atc gaa gac aag cgg gac ctg tca cgt	1739
Thr Glu Thr Val Arg Arg Ala Ile Glu Asp Lys Arg Asp Leu Ser Arg	
390 395 400	
ata gcg ttc gga att gca tcc tat ctc gaa atg ctg cgt ggt cgc gac	1787
Ile Ala Phe Gly Ile Ala Ser Tyr Leu Glu Met Leu Arg Gly Arg Asp	
405 410 415	
gag aag ggc ggg acg tat gaa tcg tcc gag cgc act tat ggc gac gcc	1835
Glu Lys Gly Gly Thr Tyr Glu Ser Ser Glu Pro Thr Tyr Gly Asp Ala	
420 425 430	
gaa tgg aag ttg gcc aag gcg gac gac ttc gaa agc tct ctg aag ctc	1883
Glu Trp Lys Leu Ala Lys Ala Asp Asp Phe Glu Ser Ser Leu Lys Leu	
435 440 445	
ccg gcg ttc gat ggg tgg cgc gat ctg gat acg tcc gaa ctg gat caa	1931
Pro Ala Phe Asp Gly Trp Arg Asp Leu Asp Thr Ser Glu Leu Asp Gln	
450 455 460 465	
aag gtc atc gtg ctg cgg aag atc atc cgc gaa aag ggc gta aaa gcc	1979
Lys Val Ile Val Leu Arg Lys Ile Ile Arg Glu Lys Gly Val Lys Ala	
470 475 480	
gcc atc ccg gcc tga attcggcttt tagggtagcg actgaaaacag aaaaccgcgc	2034
Ala Ile Pro Ala	
485	
tctggaaagga gcgcggtttt ttttatgctc agatctgtcc catcaggaca aggatcacga	2094

cgaccacgat	caggacaagt	ccgctggagg	gggagcccc	tttcgaactg	tacggccatg	2154	
acggcagcgc	accgagatca	ggattacaag	aaggatcagt	cccatggcac	atctctttg	2214	
ccggttggaa	ctggtctgt	ttccgggtgt	ctaaaaaagtt	tccgttagggg	cgcgaaagat	2274	
caaagctgtc	ggtcgcgc	tttccggtcc	caagccgc	cat	tgatgcggc	2334	
tgtgcgcgtt	tgcgctctgt	ctctgacata	ggttctggg	ccagcacgtc	cggatgtatgt	2394	
tcgcggatca	gggtgcgc	ccgcacgcgg	atttctgtgt	cagttgegct	gcgggtgtatg	2454	
ccgagaatac	gataggc	ccgcgtt	ccgctggcgg	cgcgattgtt	gccgc	2514	
gcccggtccc	atgcctctgg	cgccaggca	aatgc	ccgcgt	cagaaaatcg	2574	
atttccttcg	ggtgaagctc	gcggctggg	ccggc	atcg	cacggcgat	2634	
gccgtcatga	ggttctcaag	cgccgcgt	ttatcg	ccat	aggcttgcc	2694	
gcatacatct	cgaatcg	cgccgtc	cgccgcgt	cgaac	acgcgt	2754	
ttgggtttat	cgggggggaa	ctggaa	gcag	gtctt	gaaag	cggttgc	2814
accggcccgt	cgatcttcgc	cagctc	gcg	tcact	ccgcgt	2874	
tgatctcg	tgcccaggc	cgccag	caatc	ttggc	aggc	cgcgttgc	2934
ggatcggac	ggccattcgc	ggaaagcgc	tcact	ccgcgtt	ggcgttgc	2994	
agcgaaccgt	tatcg	ccgc	atgc	gctgc	ccat	gaaaggacca	3054
ccaaccgcga	agcccgc	gac	accac	atcttgc	ccc	atcaacc	3114
tagcac	gctcac	agcg	gcaat	gatcg	cagg	taggtgt	3174
ccaa	ccccc	ggg	ttgc	gg	tcgttgc	atcgat	3234
tgcttt	tgag	gcgc	agg	ttc	atcg	atcgat	3294
atcc	agact	ctact	tcgat	ccctt	tcgt	atcgat	3354
aag	ctgc	caat	gtgg	cc	tcgt	atcgat	3414
tgg	ttcg	gg	cg	atgc	gg	atcgat	3474
ttt	ctgg	gt	gt	gt	gt	atcgat	3534
ttc	cgcc	tc	tc	tc	tc	atcgat	3594
ggc	ttcc	gg	ca	cc	cc	atcgat	3654
gtc	actg	ctg	caac	gtc	gtc	atcgat	3714
agaga	aggc	cc	cc	cc	cc	atcgat	3774
gcc	caga	cc	cc	cc	cc	atcgat	3834
tt	gac	ca	ctt	cc	cc	atcgat	3894
cg	aa	cc	cc	cc	cc	atcgat	3954
cg	gg	cc	cc	cc	cc	atcgat	4014
tt	gac	gg	cc	cc	cc	atcgat	4074
tc	gag	tt	cc	cc	cc	atcgat	4115

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

7/12

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 3

gctgctgagt gatccg 16

&lt;210&gt; 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 4

gactgctact tcgatcc 17

&lt;210&gt; 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 5

cctacaccta gcctgc 16

&lt;210&gt; 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

8/12

<400> 6  
cagtccgtc atgagg 16

<210> 7  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

<400> 7  
tcctgatctc ggtgcg 16

<210> 8  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

<400> 8  
gatgcttcag cacggc 16

<210> 9  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

<400> 9  
gacgatcacg gaaggc 16

<210> 10

9/12

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 10

ggttacgtgg tcgacg 16

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 11

ctataacctga caggtcc 17

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 12

gcgcgatctg gatacg 16

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

10/12

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

&lt;400&gt; 13

cgaggatctc gaacgg 16

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as sense primer for amplifying DNA sequence encoding His-tagged SLDH and promoter.

&lt;400&gt; 14

cggattgcta gcgatggc 18

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as antisense primer for amplifying DNA sequence encoding His-tagged SLDH and promoter.

&lt;400&gt; 15

atcgaggatc ctcaatgatg atgatgatga tgggccggga tggcgcc 47

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Oligonucleotide designed to act as sense primer for amplifying DNA sequence of 3' non-coding region of SLDH gene.

11/12

<400> 16  
atcgaggatc cattcggtt ttagggtagc 30

<210> 17  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as antisense primer for amplifying DNA sequence of 3' non-coding region of SLDH gene.

<400> 17  
tagctgagct catggacacag atctgagc 28

<210> 18  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Gluconobacter oxydans

<220>  
<223> N-terminal amino acid sequence of SLDH.

<400> 18  
Met Ile Thr Arg Glu Thr Leu Lys Ser Leu  
1 5 10

<210> 19  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (sense) for introducing Ssp I restriction site into 5' upstream region of SLDH coding sequence.

<400> 19  
taggaatatt tctcatgatt acgcgcgaaa ccc 33

12/12

<210> 20

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (antisense) for introducing Ssp I restriction site into 5' upstream region of SLDH coding sequence.

<400> 20

gatgcttcag cacggc 16

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01608

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,  
 (C12N 9/04, C12R 1:01) (C12N 15/53, C12R 1:01) (C12N 1/21, C12R 1:19)  
 (C12N 1/21, C12R 1/01) (C12N 1/21, C12R 1:02) (C12N 1/21, C12R 1:38)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),  
 Genbank/EMBL/DDJB/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim N .
PX PY	OSAO ADACHI et al., "Crystallization and properties of NADPH-dependent L-sorbose reductase from Gluconobacter melanogenus IFO 3294", Bioscience Biotechnology Biochemistry (Dec.1999), Vol.63, No.12, p.2137-2143	1-5 6-22
PY	WO, 99/20763, A1 (FUJISAWA PHARM CO LTD), 29 April, 1999 (29.04.99) (Family: none)	1-22
PX PY	EP, 955358, A2 (HOFFMANN LA ROCHE & CO AG F), 10 November, 1999 (10.11.99) & CA, 2265239, A1 & JP, 2000-060576, A	1-10,12-16 11,17-22
A	KR, 98069057, A (KOREA ADV INST SCI & TECHNOLOGY), 26 October, 1998 (26.10.98) (Family: none)	1-22
A	YOUNG-MIN PARK et al., "Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by Gluconobacter suboxydans cells immobilized in calcium alginate", Biotechnology Letters (1994) , Vol.16 , No.4 , p.345-348	1-22

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
26 June, 2000 (26.06.00)Date of mailing of the international search report  
04 July, 2000 (04.07.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile N .

Telephone N .

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/01608

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,  
 (C12N 9/04, C12R 1:01) (C12N 15/53, C12R 1:01) (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1/01)  
 (C12N 1/21, C12R 1:02) (C12N 1/21, C12R 1:38)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

Swiss Prot/PIR/GeneSeq, MEDLINE(STN),  
 Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X P Y	OSAO ADACHI et al., "Crystallization and properties of NADPH-dependent L-sorbose reductase from Gluconobacter melanogenus IF0 3294", Bioscience Biotechnology Biochemistry (Dec. 1999), Vol. 63, No. 12, p. 2137-2143	1-5 6-22
P Y	W0,99/20763, A1 (FUJISAWA PHARM CO LTD) 29.4月.1999 (29.04.99) ファミリーなし	1-22

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 06. 00

国際調査報告の発送日

04.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

光本 美奈子

4 B 9359



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

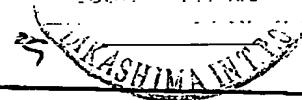
(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKASHIMA, Hajime  
Yuki Building  
3-9, Hiranomachi 3-chome  
Chuo-ku  
Osaka-shi  
Osaka 541-0046  
JAPON

2001-09-21 2000



Date of mailing (day/month/year)
21 September 2000 (21.09.00)

Applicant's or agent's file reference
09348

## IMPORTANT NOTICE

International application No.	International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
PCT/JP00/01608	16 March 2000 (16.03.00)	17 March 1999 (17.03.99)
Applicant	FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al	

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), the International Bureau, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
CA,CN,EP,JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 21 September 2000 (21.09.00) under No. WO 00/55329

## REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

## REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 09348	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPOO/01608	国際出願日 (日.月.年) 16.03.00	優先日 (日.月.年) 17.03.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl' C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,		
出願人（氏名又は名称） 藤沢薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で        ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I  国際予備審査報告の基礎  
II  優先権  
III  新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成  
IV  発明の単一性の欠如  
V  PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明  
VI  ある種の引用文献  
VII  国際出願の不備  
VIII  国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 04.09.00	国際予備審査報告を作成した日 16.10.00
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 山村 祥子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4N 9217

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第6条（PCT14条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17）

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5.  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。（PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。）

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-22	有
	請求の範囲		無
進歩性 (I S)	請求の範囲	1-22	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲	1-22	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

## 文献1：

KR, 98069057, A (KOREA ADV INST SCI & TECHNOLOGY)  
26.10月.1998 (26.10.98)

## 文献2：

YOUNG-MIN PARK et al., "Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* cells immobilized in calcium alginate", *Biotechnology Letters* (1994), Vol. 16, No. 4, p. 345-348

請求の範囲1-22に係る発明は、国際調査報告で引用された文献1、及び文献2には開示されておらず、新規性を有する。

請求項1に記載された理化学的性質を有する酵素、配列番号1に示されるアミノ酸配列及び配列番号2で示されるDNAは、上記の何れの文献にも開示されていない。

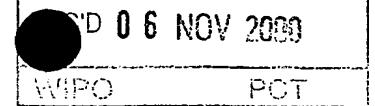
## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 99/20763, A1 [E, Y]	29. 04. 99	13. 10. 98	17. 10. 97
EP, 955358, A [E, XY]	10. 11. 99	08. 03. 99	13. 03. 98

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)



特許協力条約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 09348	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPOO/01608	国際出願日 (日.月.年) 16.03.00	優先日 (日.月.年) 17.03.99
国際特許分類 (IPC) Int.C1' C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,		
出願人（氏名又は名称） 藤沢薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>4</u> ページからなる。
<input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u>      </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input checked="" type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 04.09.00	国際予備審査報告を作成した日 16.10.00
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 山村 祥子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488
	4N 9217

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第6条（PCT14条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17）

出願時の国際出願書類

明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、

出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、

出願時に提出されたもの  
PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、

出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、

出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
 PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

この国際出願に含まれる書面による配列表  
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表  
 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5.  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。（PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。）

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-22 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

進歩性 (I S)

請求の範囲 1-22 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-22 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

## 文献1：

KR, 98069057, A (KOREA ADV INST SCI & TECHNOLOGY)  
26. 10月. 1998 (26. 10. 98)

## 文献2：

YOUNG-MIN PARK et al., "Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by Gluconobacter suboxydans cells immobilized in calcium alginate", Biotechnology Letters (1994), Vol. 16, No. 4, p. 345-348

請求の範囲 1-22に係る発明は、国際調査報告で引用された文献1、及び文献2には開示されておらず、新規性を有する。

請求項1に記載された理化学的性質を有する酵素、配列番号1に示されるアミノ酸配列及び配列番号2で示されるDNAは、上記の何れの文献にも開示されていない。

## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 99/20763, A1 [E, Y]	29. 04. 99	13. 10. 98	17. 10. 97
EP, 955358, A [E, XY]	10. 11. 99	08. 03. 99	13. 03. 98

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)

ST  
Translation

**PATENT COOPERATION TREATY**  
**PCT**  
**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**  
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 09348	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/01608	International filing date (day/month/year) 16 March 2000 (16.03.00)	Priority date (day/month/year) 17 March 1999 (17.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/53, 9/04, 1/21, C12P 19/02, 7/60		
<p><b>Applicant</b>  <b>FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.</b></p>		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

I  Basis of the report  
II  Priority  
III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability  
IV  Lack of unity of invention  
V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement  
VI  Certain documents cited  
VII  Certain defects in the international application  
VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 September 2000 (04.09.00)	Date of completion of this report 16 October 2000 (16.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01608

## I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:<sup>\*</sup> the international application as originally filed the description:pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ the claims:pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19)  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ the drawings:pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ the sequence listing part of the description:pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4.  The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages \_\_\_\_\_ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_5.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).<sup>\*\*</sup>

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP00/01608

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

Document 1: KR, 98069057, A (Korea Adv. Inst. Sci. & Technology), 26 October, 1998 (26.10.98)

Document 2: Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* cells immobilized in calcium alginate, (Young-Min Park et al.), Biotechnology Letters, 1994, Vol. 16, No. 4, pages 345-348

The subject matter of claims 1-22 is not disclosed in either of documents 1 or 2 cited in the ISR, and is thus considered to be novel.

The enzyme having the physico-chemical properties disclosed in claim 1, the amino acid sequence represented by sequence no. 1, and the DNA represented by sequence no. 2, are not disclosed in either of the above-mentioned documents.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01608

## VI. Certain documents cited

## 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO,99/00762, A1 [E,Y]	29 April 1999 (29.04.1999)	13 October 1998 (13.10.1998)	17 October 1997 (17.10.1997)
EP,9533358,A [E,XY]	10 November 1999 (10.11.1999)	08 March 1999 (08.03.1999)	13 March 1998 (13.03.1998)

## 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)
<del>.....</del>	<del>.....</del>	<del>.....</del>

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKASHIMA, Hajime  
 Fujimura Yamato Seimei Building  
 2-14, Fushimimachi 4-chome  
 Chuo-ku  
 Osaka-shi  
 Osaka 541-0044  
 JAPON

Date of mailing (day/month/year) 05 September 2001 (05.09.01)	
Applicant's or agent's file reference 09348	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/01608	International filing date (day/month/year) 16 March 2000 (16.03.00)

1. The following indications appeared on record concerning:						
<input type="checkbox"/> the applicant		<input type="checkbox"/> the inventor		<input checked="" type="checkbox"/> the agent	<input type="checkbox"/> the common representative	
Name and Address  TAKASHIMA, Hajime Yuki Building 3-9, Hiranomachi 3-chome Chuo-ku Osaka-shi Osaka 541-0046 Japan			State of Nationality		State of Residence	
			Telephone No.			
			Facsimile No.			
			Teleprinter No.			
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:						
<input type="checkbox"/> the person		<input type="checkbox"/> the name		<input checked="" type="checkbox"/> the address	<input type="checkbox"/> the nationality	<input type="checkbox"/> the residence
Name and Address  TAKASHIMA, Hajime Fujimura Yamato Seimei Building 2-14, Fushimimachi 4-chome Chuo-ku Osaka-shi Osaka 541-0044 Japan			State of Nationality		State of Residence	
			Telephone No.			
			Facsimile No.			
			Teleprinter No.			
3. Further observations, if necessary:						
4. A copy of this notification has been sent to:						
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office		<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned				
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority		<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned				
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority		<input type="checkbox"/> other:				

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  Masashi HONDA
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

## PATENT COOPERATION TREATY

## From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 25 October 2000 (25.10.00)	in its capacity as elected Office
<b>International application No.</b> PCT/JP00/01608	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 09348
<b>International filing date</b> (day/month/year) 16 March 2000 (16.03.00)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 17 March 1999 (17.03.99)
<b>Applicant</b>	
SHIBATA, Takashi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

04 September 2000 (04.09.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election  was

100

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p><b>The International Bureau of WIPO</b>  <b>34, chemin des Colombettes</b>  <b>1211 Geneva 20, Switzerland</b></p>	<p><b>Authorized officer</b>  <b>Antonia Muller</b></p>
<p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

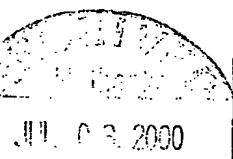
(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year)
20 June 2000 (20.06.00)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKASHIMA, Hajim  
Yuki Building  
3-9, Hiranomachi 3-chome  
Chuo-ku  
Osaka-shi  
Osaka 541-0046  
JAPON



JUN 2000

Applicant's or agent's file reference 09348	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>	
International application No. PCT/JP00/01608	International filing date (day/month/year) 16 March 2000 (16.03.00)	
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 17 March 1999 (17.03.99)	
Applicant FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al		

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
17 Marc 1999 (17.03.99)	11/72810	JP	05 June 2000 (05.06.00)
06 Augu 1999 (06.08.99)	11/224679	JP	05 June 2000 (05.06.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Tessad I PAMPLIEGA Telephone N . (41-22) 338.83.38
--	---

Form PCT/IB/304 (July 1998)

003382962

## 特許協力条約

E P



PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 09348	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/01608	国際出願日 (日.月.年) 16.03.00	優先日 (日.月.年) 17.03.99
出願人(氏名又は名称) 藤沢薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。 この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
 この国際出願に含まれる書面による配列表 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。2.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。3.  発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。4. 発明の名称は  出願人が提出したものを承認する。 次に示すように国際調査機関が作成した。5. 要約は  出願人が提出したものを承認する。 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。6. 要約書とともに公表される図は、  
第\_\_\_\_\_図とする。  出願人が示したとおりである。 なし 出願人は図を示さなかった。 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,  
 (C12N 9/04, C12R 1:01) (C12N 15/53, C12R 1:01) (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1/01)  
 (C12N 1/21, C12R 1:02) (C12N 1/21, C12R 1:38)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/53, C12N 9/04, C12N 1/21, C12P 19/02, C12P 7/60,

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Swiss Prot/PIR/GenSeq, MEDLINE(STN),  
 Genbank/EMBL/DDBJ/GenSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X P Y	OSAO ADACHI et al., "Crystallization and properties of NADPH-dependent L-sorbose reductase from Gluconobacter melanogenus IFO 3294", Bioscience Biotechnology Biochemistry (Dec. 1999), Vol. 63, No. 12, p. 2137-2143	1-5 6-22
P Y	WO, 99/20763, A1 (FUJISAWA PHARM CO LTD) 29. 4月. 1999 (29. 04. 99) ファミリーなし	1-22

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

26. 06. 00

## 国際調査報告の発送日

04.07.00

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子

4 B 9359



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
P X	EP, 955358, A2 (HOFFMANN LA ROCHE & CO AG F) 10.11月.1999 (10.11.99)	1-10, 12-16
P Y	& CA, 2265239, A1 & JP, 2000-060576, A	11, 17-22
A	KR, 98069057, A (KOREA ADV INST SCI & TECHNOLOGY) 26.10月.1998 (26.10.98) ファミリーなし	1-22
A	YOUNG-MIN PARK et al., "Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by Gluconobacter suboxydans cells immobilized in calcium alginate", Biotechnology Letters(1994) , Vol.16 , No.4 , p.345-348	1-22